

博士論文

重症急性呼吸器症候群 (SARS) 及び新型インフルエンザ
に対する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 誘導型ワクチンの開発

甲第45号

高山 俊輔

博士論文

重症急性呼吸器症候群 (SARS) 及び新型インフルエンザ
に対する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 誘導型ワクチンの開発

高山 俊輔

目次

はじめに	頁
1. 緒言	1
2. CTL とは	1
3. CTL に注目した理由	5
4. 本研究の目的	5
 第 I 章 新規サイトカイン、IL-23 によるアジュバント効果について	
緒論	6
材料と方法	
1. 細胞	8
2. IL-12、IL-17、または IL-23 を発現・分泌させる組換え VV の作製	8
3. IL-12、IL-23 の発現と機能活性の検出	9
4. IL-17 を発現分泌させる VV	9
5. マウスと免疫	9
6. ウイルスタイトターの測定	10
7. CTL 活性の測定 (CTL assay)	10
8. 細胞内 CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ T 細胞数の測定 (Intracellular cytokine staining : ICS)	10
9. VV 特異的抗体の検出	11
10. サイトカインの検出 (Cytokine ELISA)	11
11. NK 細胞の活性	12
結果	
1. 組換え VV による IL-12 と IL-23 の発現と機能活性	13
2. BALB/c マウスにおける VV に対する IL-23 の発症防御効果	13
3. VV 特異的 CTL 活性の測定	14
4. CD8 ⁺ T 細胞中の IFN- γ ⁺ 陽性細胞数の測定	15
5. VV 特異的抗体の測定と NK 活性の測定	16
6. VV-IL-23 感染細胞の IFN- γ と IL-17 の産生	16
7. IL-12/IL-23 p40 KO マウスにおける VV に対する IL-23 の発症防御効果	17
8. IFN- γ KO マウスにおける VV に対する IL-23 の発症防御効果	18
9. BALB/c マウスにおける VV に対する IL-17 の発症防御効果	19

第Ⅱ章 ペプチド結合リボソームを用いた、重症急性呼吸器症候群 (SARS) および新型インフルエンザに対するワクチンの開発

緒論

Ⅱ-1 SARS コロナウイルス	21
Ⅱ-2 H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルス	24

材料と方法

1. マウス	27
2. 細胞	27
3. インフルエンザウイルス	27
4. 合成ペプチド	27
5. リボソーム	29
6. 免疫	29
7. 細胞内 CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ T 細胞数の測定 (Intracellular cytokine staining : ICS)	29
8. ペプチドパルスした脾細胞の静脈投与による細胞内 CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ T 細胞誘導活性の測定	30
9. in vivo CTL 活性の測定 (CTL assay)	30
10. インフルエンザウイルスのチャレンジ実験	30

結果

Ⅱ-1 SARS コロナウイルス

1. コンピューターによる SARS-CoV pp1a 由来 CTL エピトープの予測	31
2. ペプチドパルスした脾細胞の静脈投与による細胞内 CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ T 細胞誘導活性の測定	31
3. SARS-CoV pp1a 由来エピトープ特異的細胞内 CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ T 細胞数の測定	32
4. in vivo の実験系における細胞傷害活性	32
5. ペプチド濃度による SARS-pp1a-3709 由来エピトープ特異的細胞内 CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ T 細胞誘導活性に対する影響	33

Ⅱ-2 H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルス

1. コンピューターによる H5N1 亜型鳥インフルエンザ由来 CTL エピトープの予測	35
2. ペプチドパルスした脾細胞の静脈投与による細胞内 CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ T 細胞誘導活性の測定	35

3. H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルス由来エピトープ特異的細胞内 CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ T 細胞数の測定	36
4. in vivo の実験系における細胞傷害活性	36
5. H1N1、H3N2、H5N1 亜型インフルエンザウイルスを使ったウイルスチ ャレンジ実験	37
 考察	 40
 謝辞	 48
 参考文献	 49

はじめに

1. 緒言

近年、AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome)、結核、マラリアなど、さまざまな新興・再興感染症が発生し、世界中で猛威をふるっている。1997年に香港で起こった H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスの人への感染、2003年に中国で発生した SARS corona virus による重症急性呼吸器症候群 (SARS) などが記憶に新しい。日本においても、HIV の都市部を中心とした急激な広がり、SARS の自然宿主を介した侵入懸念、さらに新型インフルエンザの流行懸念など、感染症の脅威は増加している。しかしながら、これらの感染症予防に効果的なワクチンはまだ存在しない。従って、ワクチンをいち早く開発することは極めて重要なことである。

ワクチンの成否にかかわる要件は感染病原体の性質に依存する。細胞外病原体の場合、宿主の獲得免疫応答には抗体が重要な働きをする。また、ウイルスのように細胞内に入り込み増殖するような病原体の制御には、内在性抗原を認識する CD8⁺ 細胞傷害性 T 細胞 (Cytotoxic T Lymphocyte : CTL) の反応が必須である。ウイルス特異的 CTL を誘導するには、対象となるウイルスを弱毒化した生ワクチンが有効であるが、たとえ弱毒化しても感染予防のために接種するには危険性が伴う。そこで、安全なウイルスタンパク質成分を用いて免疫することで、ウイルス特異的 CTL を賦活化させる成分ワクチンの開発が重要である。筆者は、ウイルス感染症に有効な CTL 誘導型成分ワクチンの開発を目標に、安全で効率の良いウイルス特異的 CTL の誘導法を検討した。

2. CTLとは

CTL は、抗原特異的な細胞傷害活性を発揮することができるリンパ球集団であり、ウイルス感染細胞を殺傷してウイルスを排除することにより、宿主の防御免疫に貢献している。一方、CD4 陽性ヘルパー T (Th) 細胞は、CTL などによる細胞性免疫の正常な機能維持を行う。CTL は、ウイルス感染細胞を特異的に認識し、パーフォリン、グランザイムを分泌する。さらに、ウイルス感染細胞をアポトーシスへと誘導する。また CTL は、Interferon-gamma (IFN- γ)、Tumor Necrosis Factor (TNF)- α などの抗ウイルス性サイトカインを産生して効率的にウイルスを排除する。Fig. 1 で示されるように、ウイルス感染後、CTL 活性と抗体価が上昇していくとともに、ウイルス力価が次第に下降する。このように、CTL と抗体はウイルス排除機構において重要な役割を担っている¹⁾²⁾。CTL の分化・誘導には、CD4⁺ ヘルパー T 細胞の中でも、I 型ヘルパー T (Th1) 細胞が必要不可欠である。従って、効率の良い CTL 誘導型ワクチンを開発するためには、Th1 細胞の誘導を考慮する必要がある。

CTL は、主要組織適合抗原 (major histocompatibility complex : MHC) (ヒトでは human leukocyte antigen : HLA) クラス I 分子によって提示された、短いペプチドを抗原として認識し活性化される。

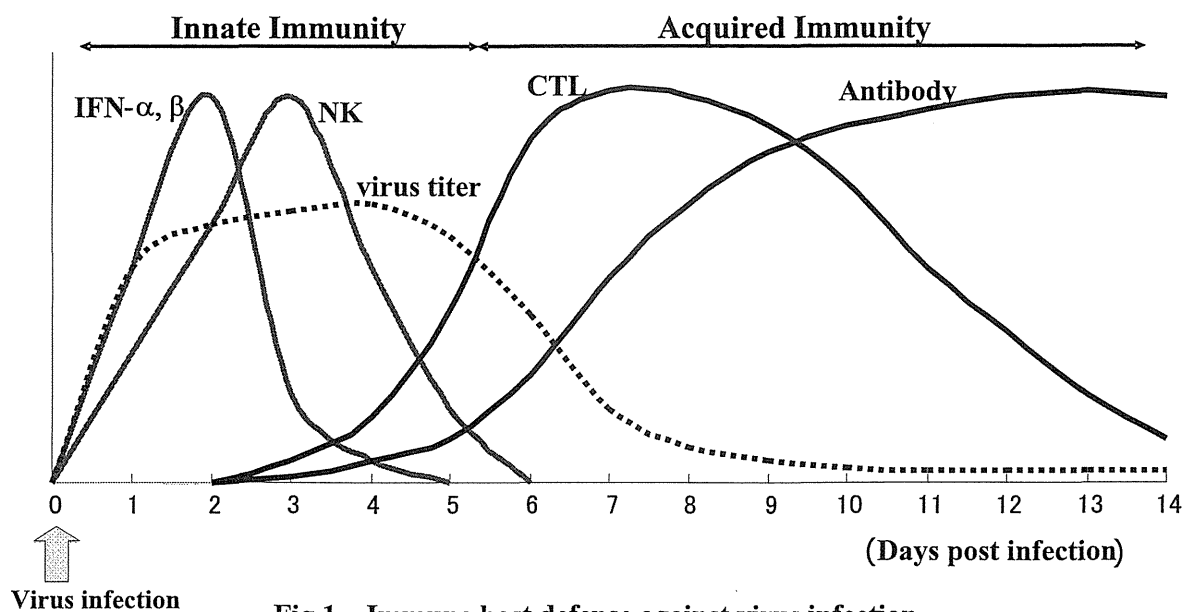


Fig.1 Immune host defense against virus infection

MHC クラス I 分子は、約 340 個のアミノ酸からなる 45-kDa の重鎖 (heavy chain) と、MHC とは連鎖していない遺伝子産物で 100 個のアミノ酸からなる 12-kDa の $\beta 2$ -microglobulin ($\beta 2m$) とが非共有結合した膜結合型タンパク質である。MHC クラス I 分子の重鎖は、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ および $\alpha 3$ の 3 つの細胞外ドメインからなり、 $\alpha 1$ と $\alpha 2$ ドメインからなる高次構造によって、抗原ペプチドが結合する大きな溝とペプチドのアミノ酸側鎖がはまり込む 6 つのポケットが形成される^{3), 4)} (Fig. 2)。

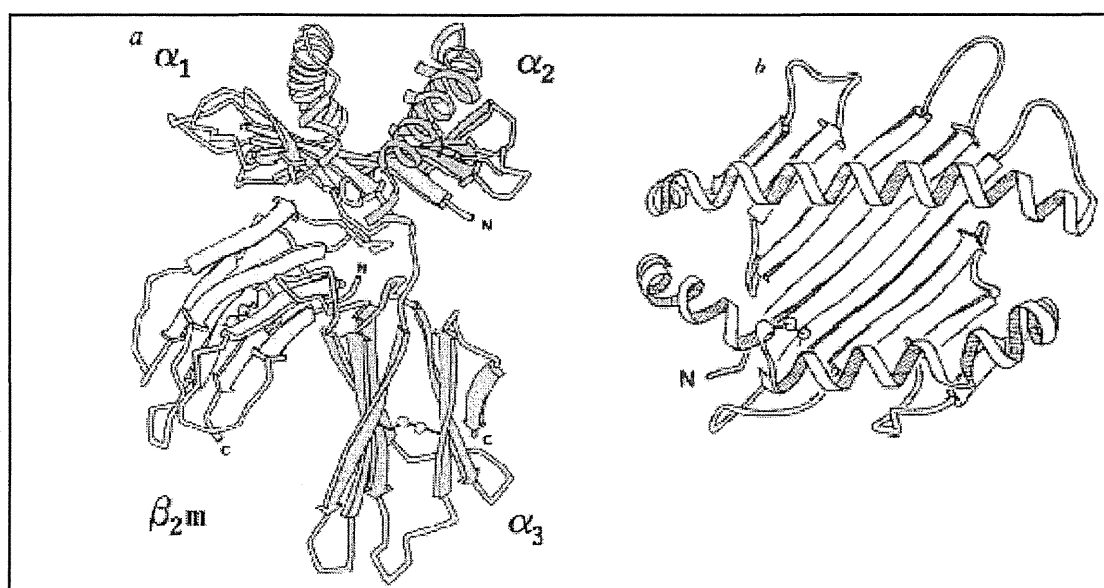


Fig. 2 Structure of HLA-A2 molecule

a: From a lateral view b: From top to bottom

$\beta 2m$ は、3 つのドメインと接触し、クラス I 重鎖のコンフォメーションに強い影響を与える。抗原ペプチドは MHC クラス I 分子に結合すると、MHC クラス I 分子を安定化させる。つまり、ペプチ

ドは MHC クラス I 分子複合体構造の一部として不可欠のものであり、ペプチドが結合していない状態の MHC クラス I 分子 (empty MHC class I molecule) は不安定である。このように、MHC クラス I 分子はどれも欠かすことのできない 3 分子で構成され、CTL 上の T 細胞レセプター (TCR) を介して CTL にウイルス由来ペプチドを抗原提示し、CTL を活性化する。Fig. 3 に示したように、ウイルスが細胞に感染すると、細胞内でウイルス遺伝子からウイルスタンパク質が作られ、プロテアソームによって分解される。

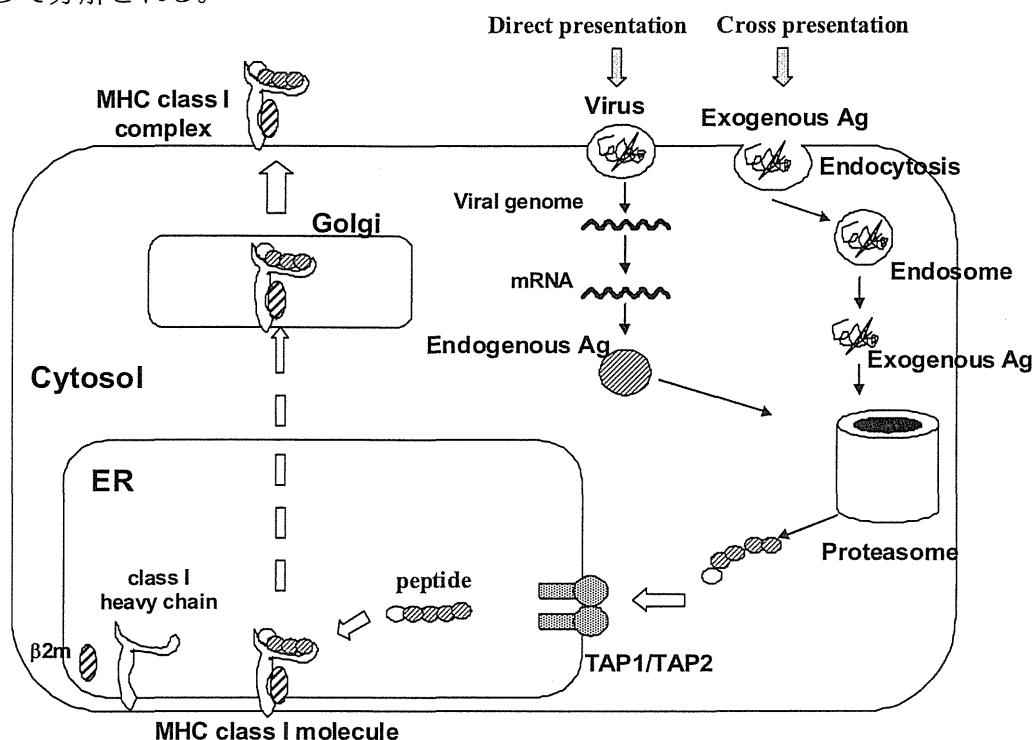


Fig. 3 Antigen processing pathway of MHC class I molecules
Direct presentation and cross presentation

プロテアソームを介して分解されたペプチド断片は、抗原処理関連トランスポーター (transporters associated with antigen processing: TAP) とよばれる分子によって、粗面小胞体内に輸送される^{5,6)}。TAP は 2 種類のタンパク質 TAP1、TAP2 からなるヘテロ二量体で、小胞体膜を貫通し ATP 依存的にペプチドを輸送する。TAP1、TAP2 遺伝子は MHC 遺伝子領域に位置し、2 つの遺伝子どちらに変異が生じても MHC クラス I 分子による抗原提示はできなくなる。この TAP の機能は、TAP 欠損細胞株を用いた研究によって見出された。TAP が欠損した細胞株では、ペプチド断片が細胞質から粗面小胞体に入れないため、クラス I 分子がペプチドと結合できず、CTL にペプチドをうまく提示することができない。TAP を通り、粗面小胞体に入ってきたペプチドは MHC クラス I 分子と結合し、ゴルジ装置で maturation され細胞表面に出て行き、CTL に認識される。以上の過程は一般的に Direct presentation と呼ばれている。また、これとは別に、Cross presentation という抗原提示過程も存在する。Cross presentation は、エンドサイトーシスで細胞内にとりこまれた外来性抗原が、エ

ンドソームから細胞質へと移行しプロテアソームで分解されたのち、TAP 依存的に粗面小胞体に輸送され、MHC クラス I 分子に結合して提示される経路である (Fig. 3)。

1991 年、Rammensee ら、および Wiley らの 2 つの研究グループは、MHC クラス I 分子に結合している自己抗原ペプチドを分離し、そのアミノ酸解析を行った^{7),8)}。その結果、結合しているペプチドのアミノ酸配列には、それぞれの MHC アリールに特有のモチーフが存在することがわかった (ペプチドモチーフ) (Table 1)。これらのペプチドは、通常 8-10 個のアミノ酸からなる。例えば、HLA-A*0201 に結合するペプチドの多くは 2 番目にロイシンやメチオニン、9 番目にバリンやロイシンをもつ。このことから、ペプチドの 2 番目と 9 番目のアミノ酸は、ペプチドと HLA-A*0201 の結合において重要なアンカーの役割を果たすと考えられた。すなわち、それぞれの MHC クラス I 分子に対応するペプチドのアンカーが、特有のアミノ酸でないと、ペプチドはそのクラス I 分子に結合しない。しかしながら、MHC クラス I 分子への結合アフィニティだけで、ペプチドの免疫原性は説明できない。むしろ、MHC クラス I 分子 - ペプチド複合体の結合後の安定性が重要であるとの報告もある⁹⁾。このように HLA タイプから、8-10 個のアミノ酸からなる CTL エピトープをある程度予測することは可能である。

Table 1 Peptide motifs associated with MHC class I molecules

Isoform of HLA	Amino acids at anchor positions									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
HLA-A*0201		L/M							V/L	
HLA-A 3		L/V/M							K/Y/F	K
HLA-A 24		Y							I/L/F	
HLA-A 68.1		V/T							R/K	
HLA-B 7		P							L/F	
HLA-B 8			K		K/R				L	
HLA-B*2705		R							L/F	
HLA-B*3501		P							Y/F/M/L/I	
HLA-B*5101		A/P/G							F/I	
HLA-B 53		P								
H-2 Kb					F/Y			L/M/I/V		
H-2 Kd		Y/F							I/L/V	
H-2 Kk		E						I	I	
H-2 Db					N				M/I	
H-2 Dd		G	P						I/L/F	
H-2 Ld		P/S							F/L/M	

3. CTL に注目した理由

CTL 誘導型ワクチンに着目する理由は主に 2 つある。1 つは、CTL が 9 つ前後のアミノ酸からなる短いペプチドを抗原として認識する¹⁰⁾のに対し、抗体は通常 20-30 のアミノ酸からなるペプチドを認識する¹¹⁾ことである。RNA ウイルスは、ウイルス複製過程で変異が起きやすいため、長いペプチドを抗原とする抗体は変異の影響を受けやすく、短いペプチドを抗原とする CTL は変異の影響を受けづらい。2 つ目は、CTL と抗体の抗原認識機構の違いがあげられる。抗体 (中和抗体) は、細胞外に存在するウイルスのエンベロープやスパイクなどの外郭タンパク質を認識しウイルスを中和する。一方、CTL は、ウイルスが感染した細胞で作られるウイルス由来タンパク質すべてを内在性抗原として認識することが出来る。そのため、抗体に比べ CTL では、エピトープのレパートリーに広がりがある。また、CTL がウイルスの作製するすべてのタンパク質を抗原として認識できるため、ウイルスの生存に関わる変異しづらい内部の構造タンパク質や、非構造的な調節性タンパク質をエピトープにできる。そして、ウイルスが細胞内に潜んで、宿主の防御反応から逃れている場合、抗体では細胞内のウイルスを中和できないのに対し、細胞内抗原を認識する CTL は、細胞を破壊してウイルス排除することに繋がる。以上の理由から、CTL は、特に抗体では防御することが難しい、難治性感染症の原因となる変異の多いウイルスに対して有効な手段となりえる。

4. 本研究の目的

我々の研究グループは、難治性の慢性ウイルス感染症や新興感染症において、ウイルス特異的メモリーCTL を強力に再活性化して、ウイルスを完全に除去するような予防・治療ワクチンの開発を試みている。短い合成ペプチドで免疫する CTL 誘導法を用いたワクチン開発は安全であるが、免疫原性が弱いため、なんらかのアジュバントを用いて免疫を強力に賦活化する必要がある。免疫を賦活化する工夫として、著者は 2 つの方法を検討した。まず 1 つ目は、細胞性免疫を促進する新規サイトカイン、IL-23 をアジュバントとして利用した研究である。2 つ目は、アジュバント効果が証明されている¹²⁾表面結合型リポソームを抗原導入のキャリアーとして用い、免疫原性が高いエピトープであるドミナントエピトープを探して、それをリポソーム表面に結合し、CTL 誘導型のワクチンとする方法である。そこで、本論文では内容を 2 つに分けて、第 I 章では新規サイトカイン、IL-23 によるウイルス感染防御効果について、第 II 章ではペプチド結合リポソームを用いた、SARS および新型インフルエンザに対するワクチンの開発について述べることにする。

第 I 章 新規サイトカイン、IL-23 によるアジュバント効果について

諸論

インターロイキン (IL) -12は、CTLなどの細胞性免疫を促進する最も強力なサイトカインであり、癌や感染症の治療に有効であると考えられる。近年、腎臓癌の患者に対して、IL-12 を使った Phase 2 臨床試験が行われた。その結果、Phase 1 臨床試験で確認された安全な許容範囲で行われたにもかかわらず、予想外に強い毒性が確認され、死亡症例がみられた¹³⁾。そのため、IL-12 の臨床応用は凍結されたままである。その後、IL-12 と構造的に極めて類似したサイトカイン、IL-23 が IL-6 の構造に基づいたデータベース検索によって 2000 年に発見された。IL-23 は、その構造的類似性のため、当初、IL-12 と同様に Th1 を誘導する機能をもつと考えられ、臨床応用において毒性を示した IL-12 に代わる有望なサイトカインとしてその重要性が認識された。

IL-12 は、IL-6 サイトカインファミリーに属し、二つのサブユニット p40 と p35 分子からなる二量体分子である。一方、IL-23 は、IL-12 のサブユニットである p40 と新しい分子 p19 からなる二量体のサイトカインである。この p19 分子は IL-12 の p35 分子、IL-6 (single chain) などと構造的に類似している。また、受容体の構造も極めて類似している。IL-12 受容体は IL-12Rβ1 と IL-12Rβ2 からなる二量体であり、また、IL-23 の受容体も二量体である。その 1 つは IL-12 受容体を構成する IL-12Rβ1 であり、他方は IL-23 に特異的な IL-23R である¹⁴⁾。以上のように、IL-23 は IL-12 に極めて似ているため、IL-12 と同様に Th1 反応を促進すると予測されたが、宿主免疫反応調節において全く異なる役割を果していることがわかってきた。Cua らは、p19 ノックアウト (KO) マウス (IL-23 のみ欠損)、p35 KO マウス (IL-12 のみ欠損)、および p40 KO マウス (IL-12 と IL-23 の両者を欠損) を比較することにより、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis : EAE)

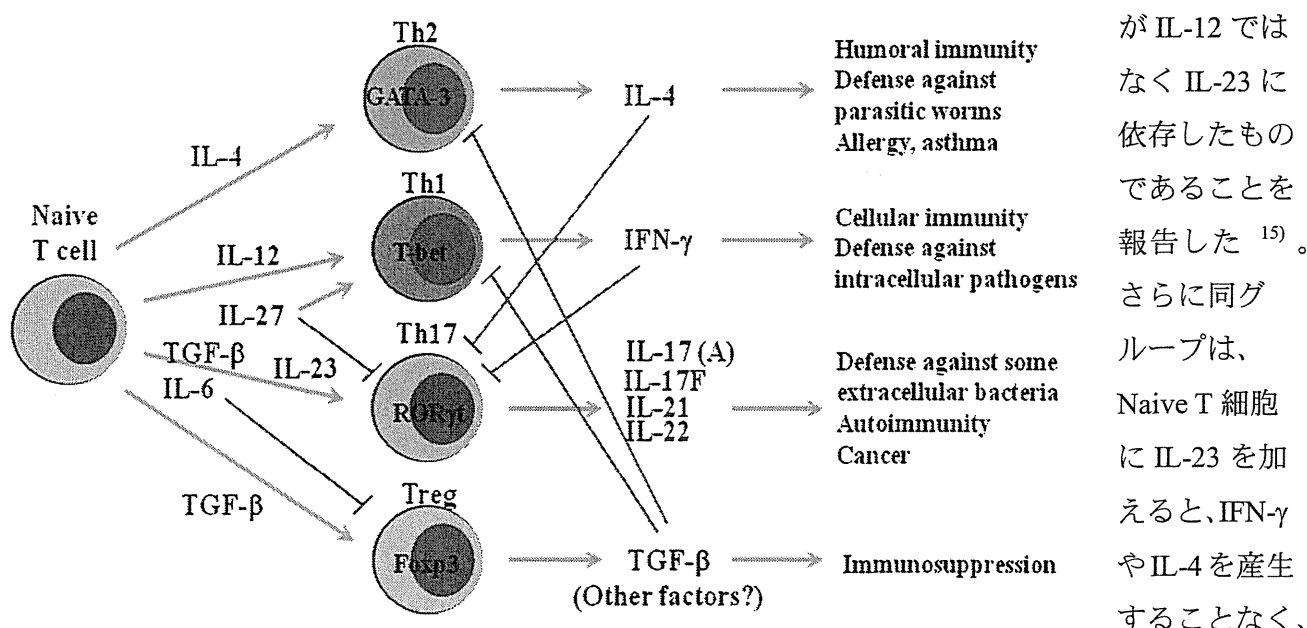


Fig. 4 Development from Naive T cell to Th1, Th2 and ThIL-17

特異的に IL-17 を産生する新しい CD4⁺ T 細胞サブセットである Th17 に分化することを報告した¹⁶⁾ (Fig. 4)。Th17 は、自己免疫疾患をおこす新しい CD4⁺ T 細胞サブセットとして、近年の免疫学で大変注目されている。最新の知見では、TGF- β と IL-6 およびそれに続く IL-21 が Naive T 細胞を Th17 に分化させ、転写因子 ROR γ t を発現させる。そして、IL-23 レセプターが発現され、IL-23 が STAT3 を介して Th17 を amplify し full-function を与えると考えられている¹⁷⁾。IL-17 は炎症性サイトカイン、ケモカインの産生誘導や細胞遊走を介して炎症を誘導するサイトカインであり、IL-23 による炎症誘導は主として IL-17 を介したものであると考えられる。しかしながら、まだ Th17 の分化誘導を含めた IL-23 の機能は十分に理解されていない。

ワクシニアウイルス (VV) は天然痘のワクチンとして多くの人々に接種されてきたウイルスである。天然痘の根絶以降は、VV に外来遺伝子を組み込んで、簡便で効率のよい遺伝子発現ベクターとして、広く用いられている。このウイルスは、ほとんどの哺乳動物由来の培養細胞に感染可能であり、ゲノムサイズが大きいため、多種類の外来遺伝子を挿入できる。また、VV は、マウスに感染して病気を引き起こすため、サイトカインなど免疫に関係する遺伝子を組み込んだ組換え VV を使って、それらの遺伝子産物が、ウイルス感染症に対してどのような生体防御効果を示すかを生体内で観察することができる。今回、私は、IL-12 または IL-23 を発現する組換え VV (VV-IL-12, VV-IL-23) を作製し、これらを用いてウイルス感染における IL-23 の機能を IL-12 と比較し、IL-12 に代わるアジュバントとしての可能性を検討した。さらに、VV-IL-17 および IL-17 KO マウスを使用して、IL-23 の作用によって産生される IL-17 のウイルス感染に対する役割について検討した。

材料と方法

1. 細胞

マウス肥満細胞腫由来の P815(H-2^b)、マウスモロニー白血病ウイルス誘発リンパ腫由来の YAC-1、マウス線維芽細胞由来の NIH/3T3、ヒト骨肉腫細胞由来の C143、ヒト腎臓細胞由来の 293T、アフリカミドリザルの腎臓細胞由来の CV-1、BS-C-1 を用いた。これらの細胞は、10%ウシ胎仔血清 (fetal calf serum: FCS) と 2 mM の L-glutamine を加えた RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) 培地 (R10) および DMEM (Sigma-Aldrich) 培地 (D10) で培養した。

2. IL-12、IL-17、または IL-23 を発現・分泌させる組換え VV の作製

Concanavaline A によって刺激したマウスの脾細胞の mRNA から逆転写酵素を使って、cDNA を作製した。この cDNA から、それぞれのサイトカインに特異的なプライマー

(IL-12sense:5'-AAGCTTATGTGGGAGCTGGAGAA-3';IL-12antisense:5'-CTCGAGTCAGGCGGAGCTCAGATA-3';IL-17sense:5'-AAGCTTGCGGCTACAGTGAAGGCA-3';IL-17antisense:5'-TCTAGATTAGGCTGCCTGGCGGACA-3';IL-23sense:5'-AAGCTTATGTGGGAGCTGGAGAAA-3';IL-23antisense:5'-CTCGAGTCAAGCTGTTGGCACTAA-3') を使って、IL-12、IL-17、IL-23 を PCR で増幅し、シーケンサー (CEQ8000:BECKMAN) を用いて遺伝子配列を確認した。その遺伝子を、発現ベクター、p3xFLAG-CMV-9 (Sigma-Aldrich) に挿入した。p3xFLAG-CMV-9 は、タンパク質検出用のタグとして FLAG タンパク質をコードする遺伝子と組換えタンパク質を分泌させるためのリーダーシーケンス (LS) を含んでおり、細胞に導入されると、FLAG タンパク質が追加された融合組換えタンパ

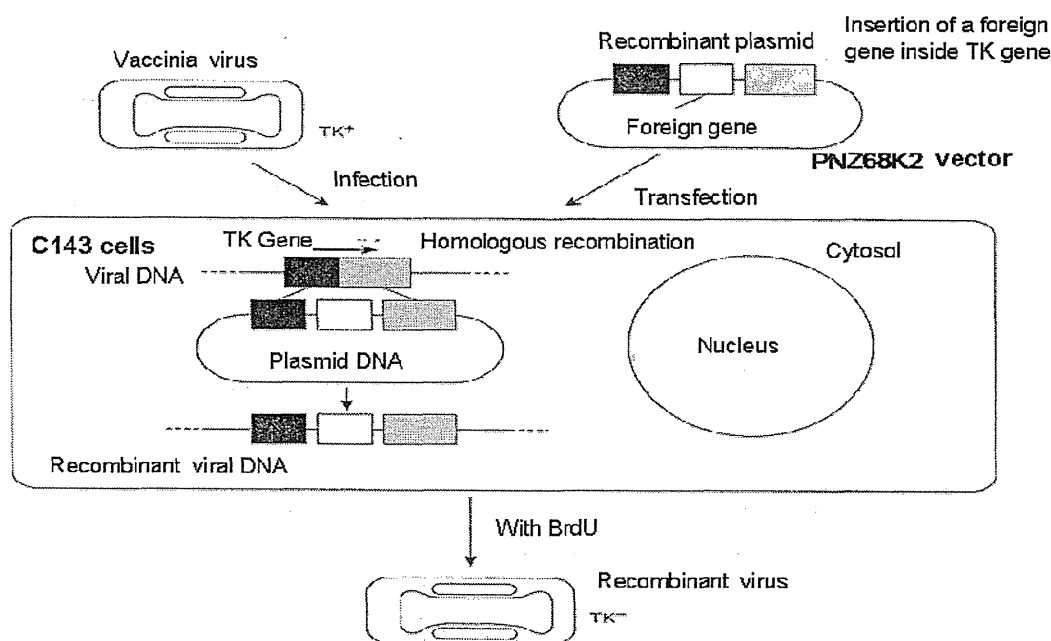


Fig. 5 Generation of VV-IL-12, VV-IL-17 or VV-IL-23.

ク質が分泌される。この組換えプラスミドから、FLAG、LSを含めた各 cDNA を PCR で増幅し、VV の一部の DNA を含む pNZ68K2 プラスミドベクターに挿入した。チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子を欠損した C143 細胞に野生型 VV (VV-WT) を感染させ、この pNZ68K2 組換えプラスミドを遺伝子導入した。C143 細胞内では、VV との相同組換えがおこり、生じた組換え VV は bromodeoxyuridine (BrdU) で選別した。野生型 VV は、TK 遺伝子によってリン酸化された BrdU をウイルス核酸に取り込み、死滅するため、相同組換えにより TK 遺伝子を欠損した組換え VV のみが生き残る (Fig. 5)。なお、本研究で使用した VV-WT は、遺伝子を挿入しても、感染性に影響を与えない¹⁸⁾。

3. IL-12、IL-23 の発現と機能活性の検出

作製した、IL-12 または IL-23 を発現・分泌する VV (VV-IL-12, VV-IL-23, VV-IL-17) をそれぞれ、293T 細胞に multiplicity of infection (MOI) =3 で感染させた。D10 を加えて 2 日間培養した後、培養上清を回収し、anti-FLAG 抗体と protein G-Sepharose を用いて免疫沈降した。沈降したタンパク質は、12% SDS-PAGE で電気泳動を行い、ニトロセルロース膜に吸着させて、anti-FLAG 抗体を使ってウエスタンブロットで分泌した IL-12 または IL-23 を検出した。

組換え VV から分泌された IL-12 と IL-23 の機能活性は、Signal transducers and activators of transcription 4 (STAT4) のチロシンリン酸化によって検討した。まず、293T 細胞に IL-12 または IL-23 のレセプター遺伝子を発現するプラスミドと STAT4 を発現するプラスミドを遺伝子導入した。この細胞に、VV-IL-12 または VV-IL-23 を感染させた細胞の培養上清を 0.2%, 2 %, 20% の濃度で加えて 45 分間培養した後、細胞を溶解して、抗リン酸化 STAT4 抗体を用いてウエスタンブロットを行い、STAT4 がリン酸化されたかどうかを検討した。

4. IL-17 を発現分泌させる VV

VV-IL-17 を 293T 細胞に MOI=3 で感染させ、2 日間培養後、その培養上清中の IL-17 の量を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) によって測定した。また、IL-17 の機能活性は NIH/3T3 細胞による IL-6 産生量から判定した。293T 細胞に VV-IL-17 を感染させ、その培養上清を NIH/3T3 細胞 (2×10^5 cells/well) に加えた。37℃、24 時間後、その培養上清中の IL-6 を ELISA で測定した。

5. マウスと免疫

BALB/c および C57BL/6 マウスは日本チャールス・リバー株式会社より購入した。IL-12/23p40 gene-knockout (KO) マウスは、The Jackson Laboratory から購入した。IFN- γ KO マウスおよび IL-17 KO マウスは、東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター 岩倉洋一郎博士から供与いただいた。いずれのマウスも 6-10 週齢のマウスを使用し、埼玉医科大学・動物施設で飼育・繁殖された。組換え VV は、マウスの腹腔内に注射して感染させた。VV-IL-17 を使ったサバイバル実験では 5×10^8 PFU/mouse 感染させ、その他のサバイバル実験では組換え VV を 2×10^9 PFU/mouse 感染させた。

6. ウイルスタイトターの測定

各々の組換え VV をマウスに感染させて (5×10^6 PFU/mouse) 1~2 週間後、卵巣を回収して卵巣内のウイルス量を測定した。卵巣はホモジナイズして、freeze-thaw を 3 回繰り返し、超音波処理して遠心後、上清をウイルス液とした。調製したウイルス液は、 $10^1 \sim 10^3$ 倍に希釈して BS-C-1 細胞に感染させ、48 時間後、0.1% クリスタルバイオレットで染色して、プラーク数を測定した。

7. CTL 活性の測定 (CTL assay) ¹⁹⁾

組換え VV (2×10^7 PFU) をマウスに感染させ、2 週間後に脾細胞を調製し、CTL アッセイにおける Effector 細胞とした。Target 細胞には、 1×10^6 個の P815 細胞に MOI=3 で 37°C 90 分間、VV-WT を感染させ、その後、100 μ Ci の $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ で 37°C、30 分間ラベルしたものを用いた。Effector 細胞と Target 細胞を様々な比率で 96 well U plate の各 well に加え、37°C で 4 時間インキュベーションし、培養上清に遊離した ^{51}Cr を測定した。測定結果から次式によって % specific lysis を算出した。

$$\% \text{ specific lysis} = [(\text{cpm}_{\text{sample}} - \text{cpm}_{\text{spontaneous}}) / (\text{cpm}_{\text{maximum}} - \text{cpm}_{\text{spontaneous}})] \times 100$$

cpm は、count per minute を表し、 $\text{cpm}_{\text{spontaneous}}$ は Effector のない状態での cpm を、 $\text{cpm}_{\text{maximum}}$ は Target 細胞を 5% Triton X-100 で lysis したときの cpm を表す。Assay は 3 回以上行った。

8. 細胞内 CD8^+ $\text{IFN-}\gamma^+$ T細胞数の測定 (Intracellular cytokine staining : ICS) ¹⁹⁾

組換え VV (5×10^7 PFU) を感染させた 1 週間後のマウスから脾細胞を調製し、96 well U plate (2×10^6 cells/well) に加えた。各ウェルに、VV-WT を感染 (MOI=3) させた P815 細胞又は非感染 P815 細胞 (2×10^5 cells/well) を加え、1 $\mu\text{l/ml}$ の brefeldin A (BFA) と共に 37°C で 5 時間インキュベーション

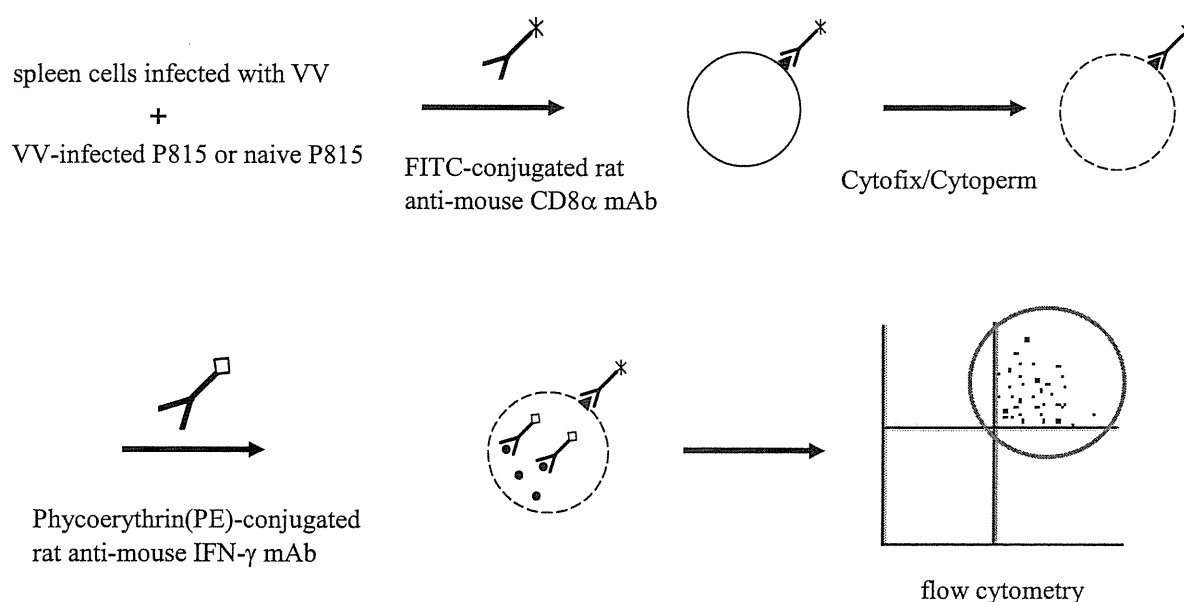


Fig. 6 Procedure of intracellular cytokine staining

ンした。その後、CD16/CD32 モノクローナル抗体 (BD Pharmingen) で細胞表面の Fc レセプターをブロックした後、FITC-conjugated rat anti-mouse CD8 α モノクローナル抗体 (BD Pharmingen) を加え 4℃で 30 分間反応させた。続いて、Cytotfix/Cytoperm kit (BD Pharmingen) を使って細胞を固定し、細胞の透過性を向上させた。その後、phycoerythrin (PE) -conjugated rat anti-mouse IFN- γ モノクローナル抗体 (BD Pharmingen) で 4℃、30 分間反応させた後、フローサイトメーターで測定した (Fig. 6)。

9. VV 特異的抗体の検出

組換え VV を感染させたマウス血清中の抗 VV 抗体を、ELISA によって測定した。まず、抗原として、VV-WT を感染させた CV-1 細胞の lysate を 0.05 M の carbonate-bicarbonate buffer (pH9.6) で希釈して、96 well flat-bottom plate に 100 μ L ずつ入れ、4℃で一晩静置した。続いて、paraformaldehyde でウイルスを固定し、5%FCS を含む PBS 溶液でブロッキングした後、各 well に $10^1 \sim 10^5$ 倍に希釈したマウスの血清を 100 μ L ずつ加えて、37℃で 1 時間反応させた。PBS-Tween で 5 回洗った後、horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgM または IgG 抗体を加えて、37℃で 1 時間インキュベーションした。その後、発色させて、492 nm における吸光度を測定した (Fig. 7)。

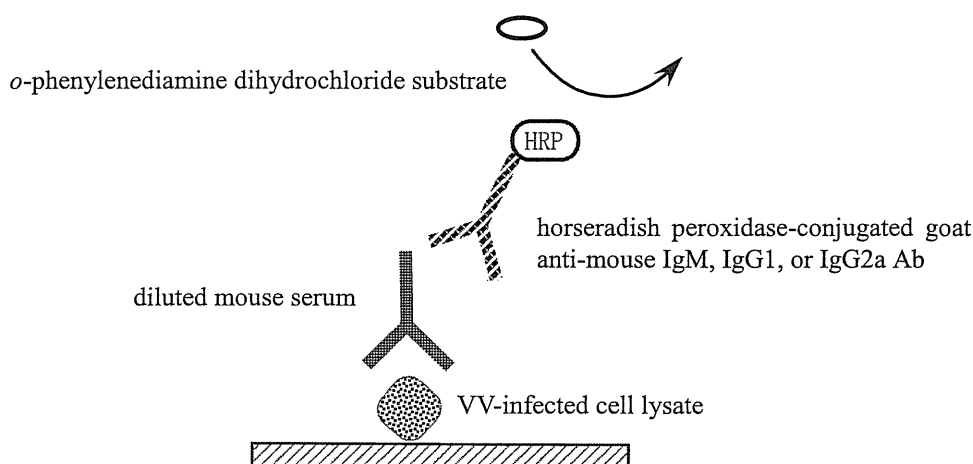


Fig. 7 Detection of VV-specific antibodies

10. サイトカインの検出 (Cytokine ELISA)

naive マウスの脾細胞を調製し、MOI=3 で組換え VV を感染させ、2 日間培養後、その培養上清中のサイトカイン量を ELISA によって測定した。まず、ELISA プレートに希釈した capture Abs を 50 μ L ずつ加えて、4℃で一晩インキュベーションしてプレートに結合させた。capture Abs (BD Pharmingen) を取り除き、blocking buffer を 100 μ L ずつ加えて 1 時間後、PBS-Tween で 3 回洗い、上述の培養上清を 100 μ L ずつ加えた。一晩インキュベーションした後、PBS-Tween で 4 回洗い、biotinylated antibody (BD Pharmingen) を 100 μ L ずつ加えて、1 時間、室温に放置したプレートを

PBS-Tween で 4 回洗い、avidin-horseradish peroxidase (Av-HRP) (BD Pharmingen) を加えて 30 分間インキュベーションした。さらに、PBS-Tween で 5 回洗い、*o*-phenylenediamine dihydrochloride を 5 mg と H_2O_2 を 5 μL 含んだ EIA buffer を 100 μL ずつ加えて 15 分～30 分間反応させて、6N H_2SO_4 を 50 μL /well 加えて反応を止めた後、492 nm における吸光度を測定した (Fig. 8)。

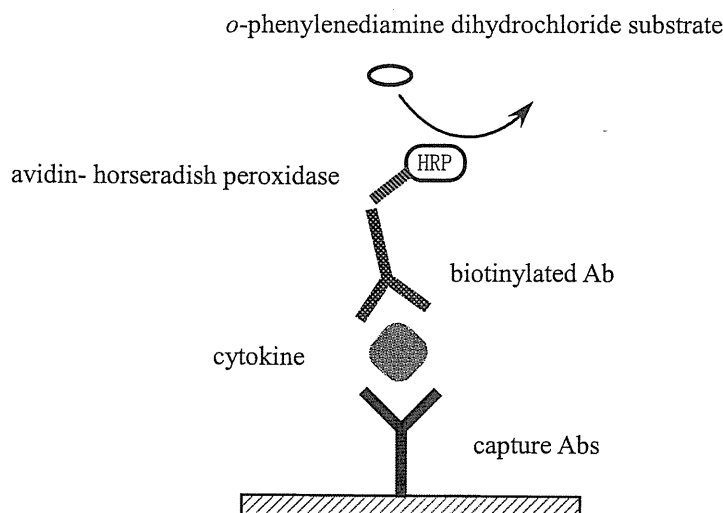


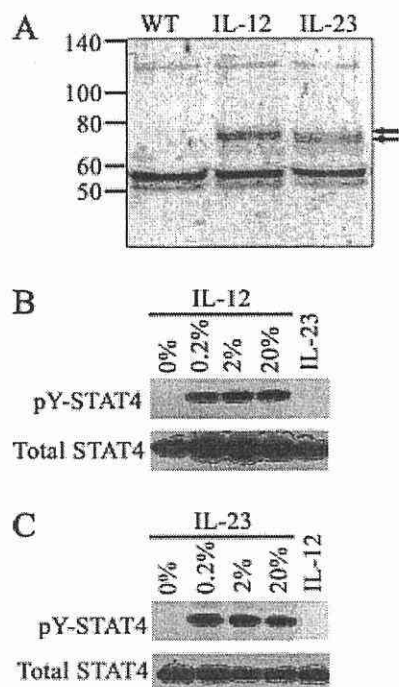
Fig. 8 The principle of cytokine ELISA

11. NK 細胞の活性

組換え VV (2×10^7 PFU) を感染させ、1～2 日後のマウスから調製した脾細胞と、コントロールとして非感染マウスから調製した脾細胞を NK assay における Effector 細胞とした。Target 細胞としては、YAC-1 細胞 (NK 細胞感受性細胞株) を使用し、100 μCi の $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ で 37°C 、30 分間ラベルしたものをを用いた。Effector 細胞と Target 細胞を様々な比率で 96 well U plate の各ウェルで混合し、4 時間 37°C でインキュベーションし、培養上清に遊離した ^{51}Cr 量を測定した。% specific lysis の求め方は上述の CTL assay と同様であるが、 $\text{cpm}_{\text{spontaneous}}$ は非感染マウスを使用したときの cpm とし、 $\text{cpm}_{\text{maximum}}$ は感染マウスを使用したときの cpm として表した。Assay は 3 回以上行った。

結果

1. 組換え VV による IL-12 と IL-23 の発現と機能活性



作製した組換え VV-IL-12 と VV-IL-23 が、機能活性のある IL-12 または IL-23 を発現するかどうかをウエスタンブロットと STAT4 のリン酸化によって調べた。Fig. 9A に示したように、IL-12、IL-23 タンパク質はそれぞれ 76 kDa、74 kDa の位置にバンドとして検出された。さらに、そのサイトカインタンパク質に、機能活性があるかどうかを STAT4 のリン酸化によって調べた (Fig. 9B & 9C)。IL-12 の受容体である IL-12Rβ1 と IL-12Rβ2 を発現した 293T 細胞において、STAT4 のチロシンは VV-IL-12 を感染させた細胞の培養上清を加えることによりリン酸化された。また IL-23 の受容体である IL-12Rβ1 と IL-23R を発現した 293T 細胞において、STAT4 のチロシンは VV-IL-23 を感染させた細胞の培養上清を加えることによりリン酸化された。これらの結果から、作製した組換え VV-IL-12 と VV-IL-23 は、それぞれ IL-12 と IL-23 を発現し、またその機能活性を示すことがわかった。

Fig. 9 Detection of the murine scIL-12 and scIL-23 fusion proteins secreted from VV-infected cells.

A, 293 T cells were infected with VV-WT (WT), VV-IL-12 (IL-12), or VV-IL-23 (IL-23). Proteins secreted in the supernatants were immunoprecipitated with the anti-FLAG mAb. The immunoprecipitated proteins were then subjected to Western blot analysis with the anti-FLAG mAb. The positions of protein molecular mass markers in kilodaltons are shown. Arrows indicate the bands of the murine scIL-12 (76 KDa) and scIL-23 (74kDa) fusion proteins. B and C, STAT tyrosine phosphorylation assay. 293T cells expressing either murine IL-12Rβ1 and IL-12Rβ2 (B), or murine IL-12Rβ1 and IL-23R (C) were stimulated for 45 min with the culture supernatant containing either murine scIL-12 (IL-12) (B) or scIL-23 (IL-23) (C) at final concentrations of 0, 0.2, 2 and 20% of the original supernatants. The cells were then subjected to Western blotting using anti-STAT4 (Total STAT4) and anti phosphorylation-STAT4 (pY-STAT4) Abs.

2. BALB/c マウスにおける VV に対する IL-23 の発症防御効果

次に、組換え VV から発現した IL-12 と IL-23 が VV 感染の抵抗性にどのような効果があるかを調べるために、マウスあたり 2×10^8 PFU (VV-WT の致死量) の組換え VV を、それぞれ BALB/c マウスに感染させ、マウスの生存率を観察した。Fig. 10A に示すように、VV-WT を感染させた 8 匹のマウスのうち 5 匹が 5 日目までに死亡した。これに対し、VV-IL-23 を感染させたマウス (n=7) は 11 日間の観察期間中すべてが生存したことから、IL-23 が VV に対する抵抗性を高めると考えられる。また VV-IL-12 を感染させたマウス (n=7) は 2 日目までに 5 匹が死亡した。これは、IL-12 の毒性によると考えられる。

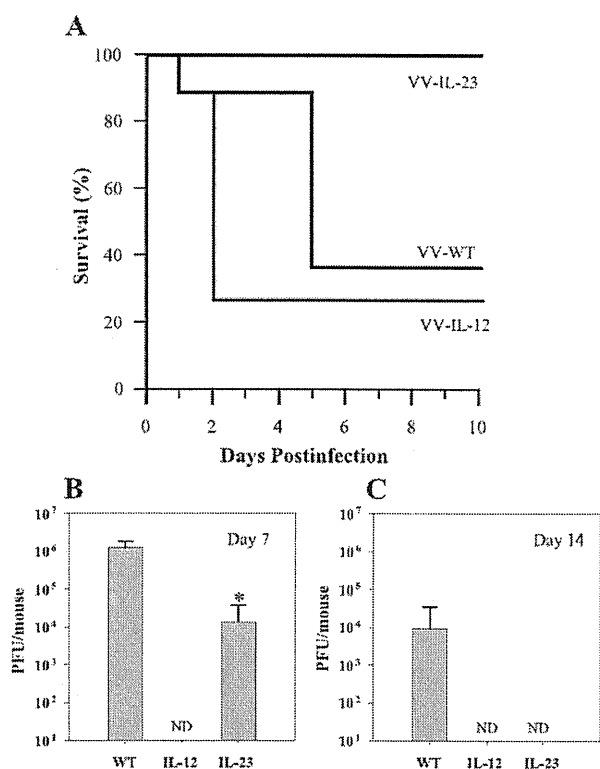


Fig. 10 IL-23 delivered by VV-IL-23 enhances resistance to VV infection in BALB/c mice.

BALB/c mice were infected i.p. with 2×10^8 PFU (A) or 5×10^6 PFU (B and C) of VV-WT, VV-IL-12, or VV-IL-23. A, Eight mice per group were monitored daily for mortality. B and C, BALB/c mice inoculated with VV-WT (WT), VV-IL-12 (IL-12), or VV-IL-23 (IL-23) were sacrificed at days 7 (B) and 14 (C) postinfection, and viral titers in ovaries were measured. From 8 to 12 mice were used in each group, and all titrations were performed in duplicates. Data are representative of one of three independent experiments, and results are shown as the mean PFU \pm SEM. ND, Not detected. *, $P < 0.001$ compared with VV-WT.

3. VV 特異的 CTL 活性の測定

次に、 ^{51}Cr リリース法を用いた CTL assay によって、CTL の killing 活性に対する IL-23 の影響を調べた。本実験では、組換え VV を感染させたマウス脾細胞を Effector 細胞として、VV-WT を感染させた P815 細胞を Target 細胞として用いた。Fig. 11 に示されるように、VV-IL-12 や VV-IL-23 を感染させたマウスでは VV-WT を感染させたマウスと比べて、VV 特異的 CTL 活性が若干高かった。従って、IL-23 が IL-12 と同様に、ウイルス特異的 CTL の活性を増強することがわかった。

さらに、ウイルスが排除されるかどうかを観察するため、マウスあたり 5×10^6 PFU の組換え VV を感染させて、7 日と 14 日後のマウスの卵巣における VV のウイルスタイターを測定した。VV-IL-12 を感染させたマウスでは、7 日および 14 日後において共に卵巣からの VV は検出されなかった。VV-IL-23 を感染させて、7 日後のマウスの卵巣における VV の PFU は、VV-WT を感染させたマウスの PFU の約 1/100 であった (Fig. 10B)。また、感染 14 日後の VV-WT を感染させたマウスでは依然として高いウイルスの PFU が認められたが、VV-IL-23 を感染させたマウスでは、VV は検出されなかった (Fig. 10C)。以上の結果から、IL-23 は IL-12 と同様に、マウス体内における VV 排除を促進することが明らかとなった。

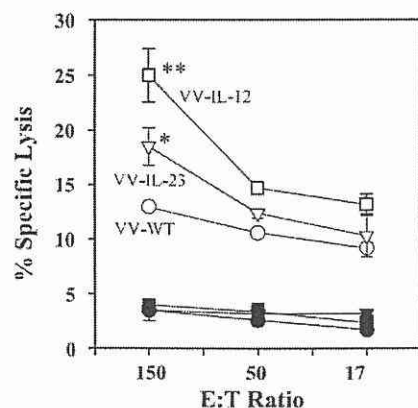


Fig. 11 Activity of VV-specific CTLs in mice infected with VV-IL-12 and VV-IL-23.

Spleen cells were prepared from mice at 2 wk after infection with 2×10^7 PFU of VV-WT (circles), VV-IL-12 (squares), or VV-IL-23 (inverted triangles). ^{51}Cr release assays were then performed to detect VV-specific CTL activity in spleen cells at various E:T ratios, using P815 cells infected with (open symbols) or without (filled symbols) VV-WT as targets. Data are representative of three independent and reproducible experiments. Results are shown as the mean \pm SEM of triplicate wells. *, $P < 0.05$ compared with VV-WT; **, $P < 0.05$ compared with VV-IL-23.

4. CD8^+ T 細胞中の $\text{IFN-}\gamma^+$ 陽性細胞数の測定

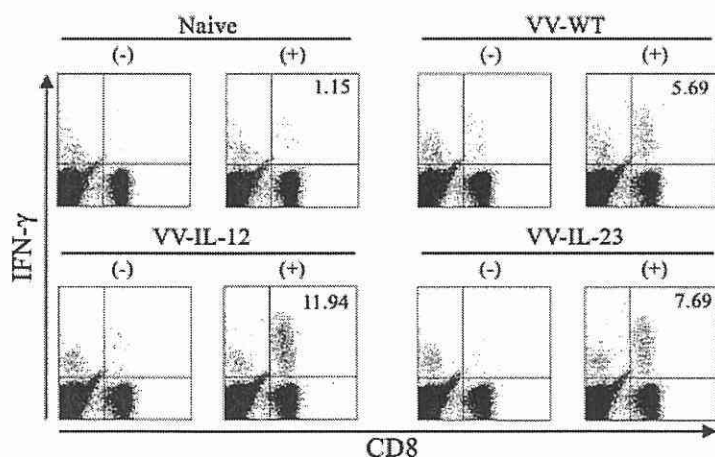


Fig. 12 Intracellular $\text{IFN-}\gamma$ staining of VV-specific CD8^+ cells in mice infected with VV-WT, VV-IL-12 and VV-IL-23.

BALB/c mice were infected with 2×10^7 PFU of either VV-WT, VV-IL-12, or VV-IL-23, and spleen cells were prepared at day 7 postinfection. Spleen cells of noninfected mice (Naive) were used as a negative control. Spleen cells were then stimulated with VV-infected P815 (+) or noninfected P815 (-) cells for 5h. After stimulation, cells were stained for their surface expression of CD8 (x-axis) with FITC-conjugated mAb and for their intracellular expression of $\text{IFN-}\gamma$ (y-axis) with PE-conjugated mAb. All lymphocytes were gated and analyzed on a FACScan flow cytometer using Cell Quest software (BD Biosciences). Values shown in upper right quadrant indicate the percentage of CD8^+ cells that are positive for intracellular $\text{IFN-}\gamma$.

活性化された CD8^+ T 細胞は、 $\text{IFN-}\gamma$ を分泌しウイルス感染の進行を防ぐために重要である。そのため、組換え VV を感染させて 1 週間後、 CD8^+ T 細胞中の $\text{IFN-}\gamma$ 陽性細胞数をフローサイトメーターによって測定した (Fig. 12)。Naive マウスや VV-WT を感染させたマウスに比べて、VV-IL-23 を感染させたマウスでは、VV-IL-12 を感染させたマウスと同様に、 CD8^+ T 細胞中の $\text{IFN-}\gamma$ 陽性細胞数が増加することが明らかとなった。この結果からも、やはり、IL-23 が IL-12 と同様に、ウイルス特異的 CTL の誘導を促進することがわかった。

5. VV 特異的抗体の測定と NK 活性の測定

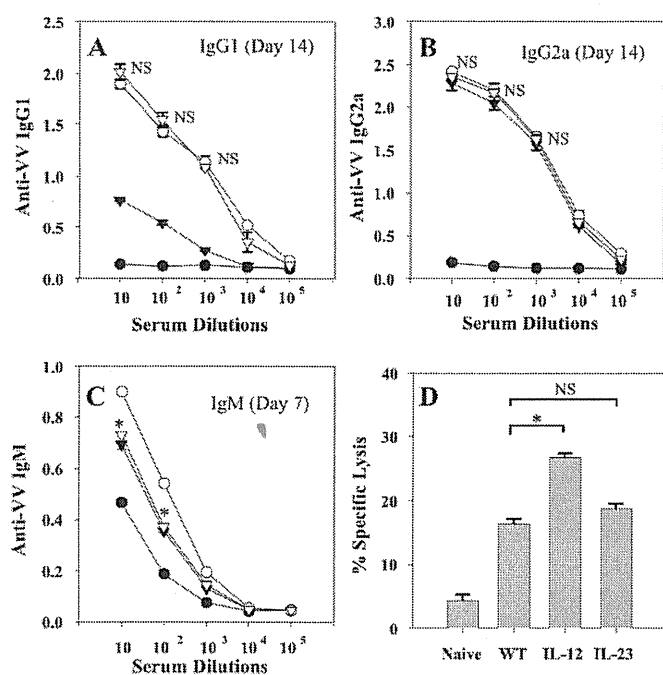


Fig. 13 VV-specific IgG and IgM Ab production and NK activity in mice infected with either VV-WT, VV-IL-12 or VV-IL-23.

A-C, BALB/c mice were infected i.p. with 2×10^7 PFU of VV-WT (○), VV-IL-12 (▼), or VV-IL-23 (▽), and serum of each mouse was collected at days 7 (C) and 14 (A and B) postinfection. Serum of noninfected mice (●) was used as negative controls. Titers of anti-VV IgG1 (A), IgG2a (B), and IgM (C) in serially diluted sera were determined by a solid-phase ELISA. Data are shown as the average \pm SEM of four to six mice per group. The experiment was repeated twice with similar results. *, $P < 0.05$ compared with VV-WT. D, NK cell-mediated cytolytic activity. BALB/c mice were infected i.p. with 2×10^7 PFU of either VV-WT (WT), VV-IL-12 (IL-12), or VV-IL-23 (IL-23). Spleen cells were prepared at day 2 postinfection and used as effector cells in standard ⁵¹Cr YAC-1 cell-killing assays.

細胞性免疫だけでなく、体液性免疫も VV 発症防御に参与する。そのため VV 特異的抗体によって VV がマウスの体内から排除されている可能性があるため、各組換え VV を感染させて、1-2 週間後のマウスの血清を希釈して、VV 特異的抗体を ELISA によって測定した。VV-IL-23 を感染させたマウスでは、VV-WT を感染させたマウスと比較して、Th1 優位の IgG2a、Th2 優位の IgG1、Total の IgM の産生量は、これらすべてにおいて同様な、もしくは低い結果となった。一方、VV-IL-12 を感染させたマウスは、Th2 優位の IgG1 が VV-WT や VV-IL-23 を感染させたマウスと比較して低く、Th1 優位の IgG2a は VV-WT や VV-IL-23 を感染させたマウスと同様の結果となった (Fig. 13A, 13B & 13C)。このことから、IL-23 が Th1 タイプの IL-12 とは違う特性であることがわかった。さらに、IL-23 は VV 特異的抗体の産生増加には関与しないことが分かった。

次に NK 細胞も VV 感染防御に寄与している可能性があるため、NK 活性についても比較した。NK 細胞は感染後早い時期に活性が高まるのが特徴であるため、 2×10^7 PFU の組換え VV を感染させて、1-2 日後のマウスの

脾細胞を使ってその活性を調べた。Fig. 13D は Effector 細胞と Target 細胞の比率が 150 対 1 のときの Specific Lysis を示す。感染後 1 日に、VV-IL-23 を感染させたマウスは、Specific Lysis が 10% から 20% であった。また、その他の VV を感染させたマウスについても、顕著な活性は見られなかった。

6. VV-IL-23 感染細胞の IFN- γ と IL-17 の産生

IL-12 は、Th1 や NK 細胞を stimulate して、ウイルス発症防御に重要な IFN- γ を産生させる。一方、IL-23 が誘導する IL-17 は、*K. pneumoniae* や *C. rodentium* のようなバクテリアに対する防御反応

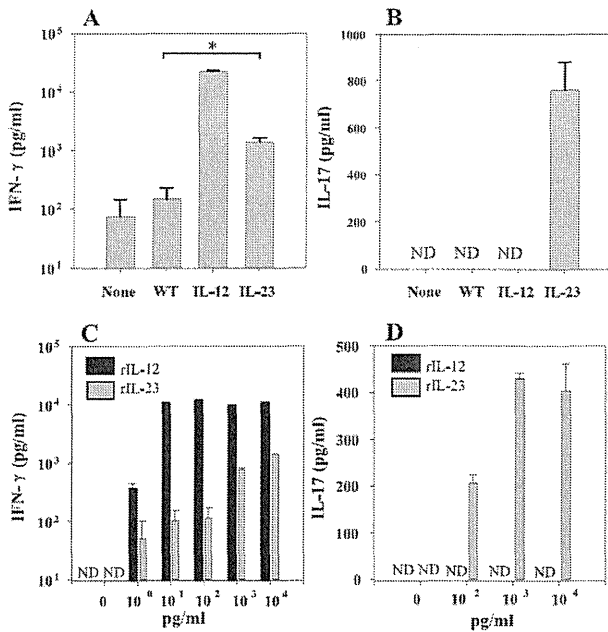


Fig. 14. VV-IL-23-infected lymphocytes produce both IFN-γ and IL-17.

A and B, Naïve spleen cells of BALB/c mice were infected in vitro with VV-WT (WT), VV-IL-12 (IL-12), or VV-IL-23 (IL-23). Noninfected spleen cells (None) were used as a negative control. C and D, Naïve spleen cells of BALB/c mice were cultured with either recombinant IL-12 or recombinant IL-23 at various concentrations. After 2 days of incubation, amounts of IFN-γ (A and C) and IL-17 (B and D) in the culture supernatants were quantitated by ELISA. Data are shown as the mean ± SEM of three to five mice per group. The experiment was repeated three times with similar results. ND, Not detected. *, $P < 0.01$.

に重要な役割を果たすことが報告されている。そこで、VV-IL-12とVV-IL-23発症防御における、IFN-γとIL-17の役割を検討することにした。

まず、BALB/cマウスの脾細胞を調製し、in vitroで各組換えVVを感染させ、2日間培養して、培養上清中のIFN-γとIL-17量をELISAで測定した。その結果、VV-WTを感染させた場合では、わずかにIFN-γが検出されなかったものの、VV-IL-12を感染させると多量のIFN-γが分泌された。一方、VV-IL-23を感染させた場合、IFN-γの産生量は、VV-IL-12の場合と比べて大幅に低下した (Fig. 14A)。また、VV-IL-23を感染させた場合、多量のIL-17が産生されたが、VV-IL-12またはVV-WTを感染させても、IL-17はまったく産生されなかった (Fig. 14B)。この結果はrIL-12もしくはrIL-23をマウスの脾細胞と一緒に培養し、IFN-γとIL-17を測定した場合と同様の結果となった (Fig. 14C & 14D)。

7. IL-12/IL-23 p40 KO マウスにおける VV に対する IL-23 の発症防御効果

さらにIL-23によるウイルス発症防御について詳しく調べるために、IL-12とIL-23の共通のサブユニットであるp40をノックアウトしたマウスを使った。まず、VV-WTの致死量 (2×10^8 PFU)の組換えウイルスを投与して、サバイバルを観察した。感染10日後、VV-WTを感染させたp40 KOマウスがすべて死亡したのに対して、VV-IL-23を感染させたp40 KOマウスはほとんど生存した (Fig. 15A)。このことから、IL-23によるVVに対する発症防御の増強効果は、IL-12 independentに作用することがわかった。次に、組換えウイルスを感染させて14日後、p40 KOマウスの卵巣のウイルス量を測定した。その結果、VV-IL-12もしくはVV-IL-23を感染させたp40 KOマウスの卵巣からはほとんどウイルスが排除されていた (Fig. 15B)。したがって、やはりIL-23がIL-12 independentに

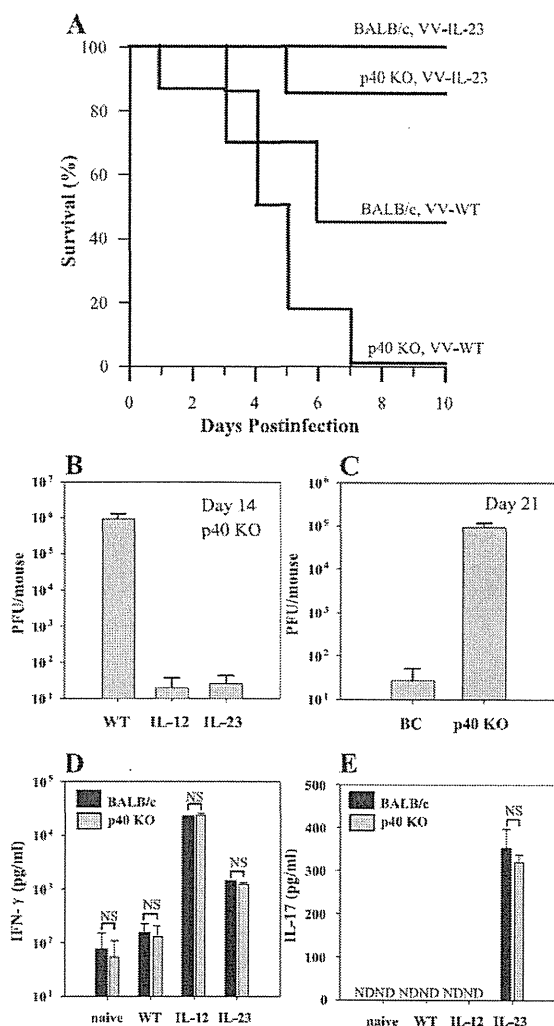


Fig. 15 IL-23 delivered by VV-IL-23 enhances resistance to VV infection in IL-12/23p40-deficient mice.

A, IL-12/23p40-deficient mice and BALB/c mice were infected i.p. with 2×10^8 PFU of VV-WT or VV-IL-23, and were monitored daily for mortality. B, IL-12/23p40-deficient mice infected with 5×10^6 PFU of VV-WT (WT), VV-IL-12 (IL-12), or VV-IL-23 (IL-23) were sacrificed at day 14 postinfection, and viral titers in ovaries were measured. From 8 to 12 mice were used in each group, and all titrations were performed in duplicates. Data are shown as the mean PFU \pm SEM. C, BALB/c mice (BC) and IL-12/23p40-deficient mice (p40 KO) were infected with 5×10^6 PFU of VV-WT and sacrificed at day 21 postinfection. Viral titers in ovaries were then measured. Data shown are the mean PFU \pm SEM. D and E, Naïve spleen cells of either BALB/c or IL-12/23p40-deficient (p40 KO) mice were infected in vitro with VV-WT (WT), VV-IL-12 (IL-12), or VV-IL-23 (IL-23). Noninfected spleen cells (Naïve) were used as a negative control. After 2 days of incubation, culture supernatants were screened for the presence of IFN- γ (D) and IL-17 (E) by ELISA.

8. IFN- γ KO マウスにおける VV に対する IL-23 の発症防御効果

さらに IFN- γ が欠損している場合の VV に対する IL-23 の発症防御能を観察するために、IFN- γ KO マウスを使って実験を行なった。まず始めに、VV-WT の致死量のウイルスを感染させて、サバイバルを観察した。その結果、VV-WT を感染させた IFN- γ KO マウスがすべて死亡したのに対して、VV-IL-23 を感染させた IFN- γ KO マウスはすべて生存した (Fig. 16A)。このことから、IFN- γ が存在しない場合でも、IL-23 は VV に対する発症防御に働いていることがわかった。次に、組換えウイ

VV に対する発症防御を増強していることがわかった。p40 KO マウスと BALB/c マウスに VV-WT を感染させて 21 日後、それらのマウスの卵巣のウイルス量を比較すると p40 KO マウスの方が VV に対する抵抗性が弱いことが確認された (Fig. 15C)。つまり、VV の発症防御に IL-12 と IL-23 が重要な役割を果たしていることが示唆された。また、マウス脾細胞に in vitro でウイルスを感染させた場合、p40 KO マウスにおいても、BALB/c マウスとまったく同様に IFN- γ と IL-17 が産生されることがわかった (Fig. 15D & 15E)。

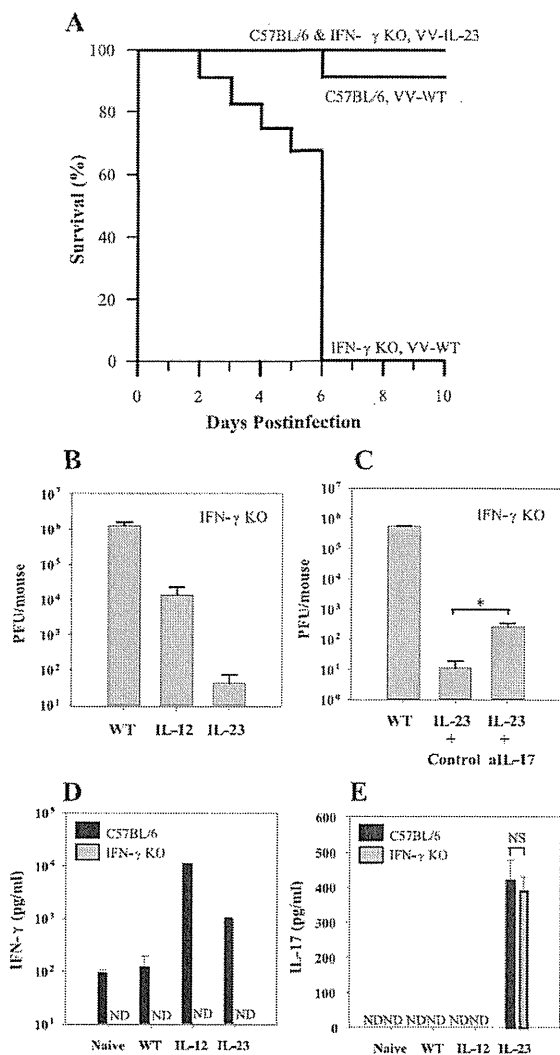


Fig. 16 IL-23 delivered by VV-IL-23 enhances resistance to VV infection in IFN- γ -deficient mice.

A, IFN- γ -deficient (IFN- γ KO) mice and C57BL/6 mice were infected i.p. with 2×10^8 PFU of VV-WT or VV-IL-23, and were monitored daily for mortality. B, IFN- γ -deficient mice infected with 5×10^6 PFU of VV-WT (WT), VV-IL-12 (IL-12), or VV-IL-23 (IL-23) were sacrificed at day 14 postinfection, and viral titers in ovaries were measured. Form 6 to 12 mice were used in each group, and all titrations were performed in duplicates. Data are shown as the mean PFU \pm SEM. C, IFN- γ -deficient mice were infected with 5×10^6 PFU of VV-WT (WT) or VV-IL-23 (IL-23). VV-IL-23-infected mice were then administered with 70 μ g of a neutralizing anti-IL17 mAb (aIL-17) or a relevant isotype control Ab (Control) at days 0, 2, 7 postinfection. Four mice were used in each group, and all titrations were performed in duplicates. Data shown are the mean PFU \pm SEM. D and E, Naive spleen cells of either C57BL/6 or IFN- γ -deficient (IFN- γ KO) mice were infected in vitro with VV-WT (WT), VV-IL-12 (IL-12), or VV-IL-23 (IL-23). Noninfected spleen cells (Naïve) were used as a negative control. After 2 days of incubation, culture supernatants were screened for the presence of IFN- γ (D) and IL-17 (E) by ELISA.

9. BALB/c マウスにおける VV に対する IL-17 の発症防御効果

IL-17 の役割をさらに詳しく検討するために、VV-IL-17 を使った実験系を構築した。BALB/c マウスに致死量のウイルスを感染させて、生存率と体重変化を観察すると、VV-WT に比べて VV-IL-17

ルスを感染させて 14 日後、IFN- γ KO マウスの卵巣のウイルス量を測定した。VV-IL-12 を感染させた IFN- γ KO マウスでは、IFN- γ が存在しないため、多量のウイルスが残存した。しかしながら、VV-IL-23 を感染させた場合は、ほとんどウイルスが排除された (Fig. 16B)。従って、サバイバル実験の結果と同様に、IFN- γ の非存在下でも、IL-23 が VV に対する感染防御に有効に働いていることがわかった。また、BALB/c マウスにおいて、IL-23 は一定量の IFN- γ 産生を誘導するが、この IFN- γ は、IFN- γ KO マウスにおいて、IL-23 による発症防御増強効果にはほとんど寄与しないことが推測される。この発症防御に IL-17 が関与していることが考えられたことから、次に抗 IL-17 抗体を用いた実験を行なった。その結果、抗 IL-17 抗体を投与すると、VV-IL-23 を感染させた場合でもウイルスが卵巣に有意に高かった (Fig. 16C)。なお、IFN- γ KO マウス脾細胞に VV-IL-23 を感染させると、当然のことながら IFN- γ はまったく産生されないが (Fig. 16D)、IL-17 の産生は C57BL/6 マウスで認められると同様に産生された (Fig. 16E)。以上の結果から、IL-23 による VV に対する発症防御の増強効果には、IL-17 が関与していることが示された。

を感染させた場合、マウスはすべて生存し、体重も回復した (Fig. 17A & 17B)。したがって、IL-17 が VV に対する発症防御を増強することがわかった。次に、組換えウイルスを感染させて、3 日後と 7 日後の BALB/c マウスの卵巣のウイルスタイターを測定した結果、感染 7 日後、VV-IL-17 を感染させた BALB/c マウスの卵巣からはウイルスが検出されなかった (Fig. 17C)。この結果からも IL-17 が VV に対する発症防御を増強していることが示唆された。さらに、IL-17 KO マウスに VV-WT の致死量のウイルスを感染させ、サバイバルを観察したところ、VV-WT の致死量の VV-IL-23 を感染させても、IL-17 KO マウスはすべて生存したため (Fig. 17D)、IL-23 による VV に対する発症防御増強作用に、IL-17 が主要な役割を果たしていないことが示唆された。

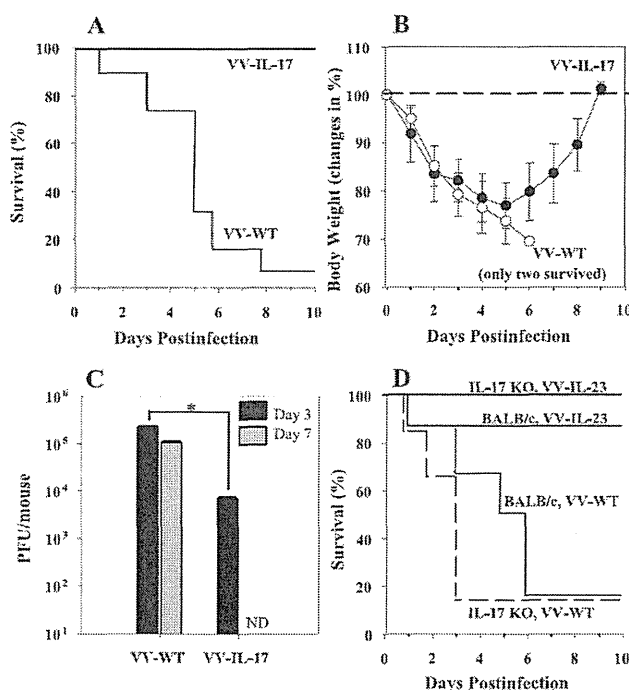


Fig. 17 Role of IL-17 in resistance to VV infection.

A and B, Twelve BALB/c mice per group were infected i.p. with 5×10^8 PFU of VV-WT or VV-IL-17. *A*, Mice were monitored daily for mortality. *B*, Changes in body weight of mice infected with VV-WT (open symbols) or VV-IL-17 (solid symbols) were calculated as the percentage of the mean weight per group in comparison with starting body weight. Data are shown as the mean \pm SEM. *C*, BALB/c mice infected with 5×10^6 PFU of VV-WT or VV-IL-17 were sacrificed at day 3 or 7 postinfection, and virus titers in ovaries of mice were measured. Six mice were used in each group, and all titrations were performed in duplicates. Data are shown as the mean PFU \pm SEM. Nd, Not detected. *, $P < 0.01$. *D*, IL-17-deficient (IL-17 KO) mice and BALB/c mice were infected i.p. with 5×10^8 PFU of VV-WT or VV-IL-23, and were monitored daily for mortality. Six mice were used in each group. Data of VV-WT-infected IL-17 KO mice were shown as a dashed line for highlighting.

第Ⅱ章 ペプチド結合リポソームを用いた、重症急性呼吸器症候群 (SARS) および新型インフルエンザに対するワクチンの開発

緒論

リポソームは、生体の細胞膜構成成分からなるため、極めて毒性が低く、ワクチンの担体として使用するのに安全性が高い。本実験では、抗原を内包した通常のリポソーム (内包型リポソーム) ではなく、抗原をリポソーム表面に共有結合させた表面結合型リポソームを用いた。表面結合型リポソームには2つの特徴がある。1つは、アレルギー様の副反応の原因となる IgE 産生が起こらないことである。Naito らの報告²⁰⁾によると、卵白アルブミン (OVA) 表面結合リポソームと、OVA に水酸化アルミニウムを吸着させたものをマウスの皮下に投与し比較した研究で、投与後の血清中には、ともに抗原特異的な IgG の産生は見られるものの、OVA 表面結合リポソーム投与において抗原特異的な IgE の産生は見られなかった。このことから、現行のワクチンに用いられているアルミニウムアジュバントで生じる IgE 抗体が関与するワクチン接種後の副反応²¹⁾を惹起しにくい。2つ目は、ペプチドタンパク質抗原を内包するリポソームと比べて、表面結合型リポソームでは、極めて効率的に CTL を誘導することである。Nagata らの実験²²⁾によると、OVA ペプチド内包型リポソームではほとんど CTL 誘導活性を示さなかったのに対し、OVA ペプチド結合リポソームでは高い CTL 誘導活性を示した。これらの2つの特徴から、アレルギー反応を誘導しにくく、細胞性免疫を強く誘導するウイルスワクチンの開発に、表面結合型リポソームを利用することとした。

Ⅱ-1 SARS コロナウイルス

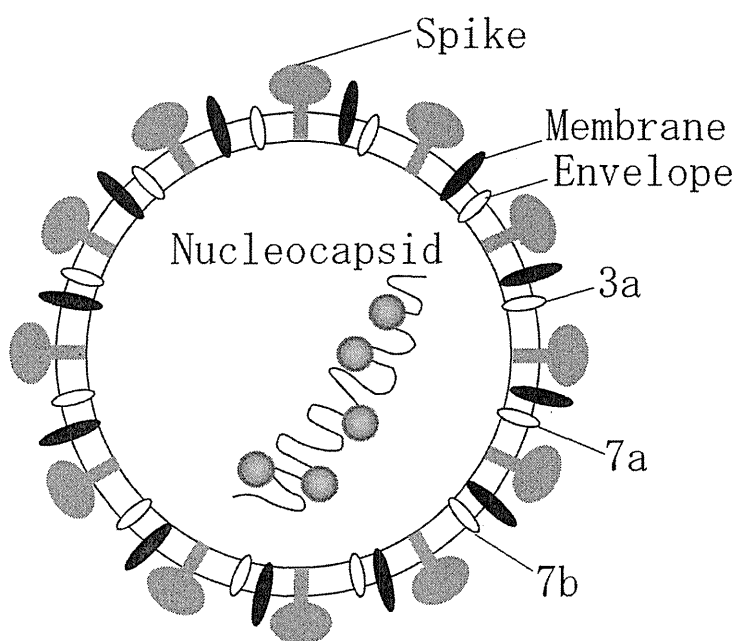


Fig. 18 Structure of the SARS virion

SARSの原因ウイルスであるSARSコロナウイルス (SARS-CoV) は、約30Kbの極めて大きなプラス鎖RNAからなる新種のコロナウイルスである。ウイルスゲノムはRNAウイルスとしては最長のゲノムであり、その5'末端にはキャップ構造を、3'末端にはpoly(A)を有する²³⁾(Fig. 19)。そのゲノムは、13-15のopen reading frame (ORF) からなり、5'末端から非構造タンパク質、レプリカーゼとプロテアーゼをコードするORF1a

(pp1a) と 1b (pp1b) があり、ウイルスの構造は少なくとも 7 つの構造、スパイク (S)、3a、エンベロープ (E)、膜 (M)、7a、7b、ヌcleoカプシド (N) で構成されている (Fig. 18)。S 領域内のレセプター結合ドメイン (RBD) は、レセプターであるアンジオテンシン変換酵素 2 (ACE2) と結合し、ウイルス侵入に重要な役割をする。

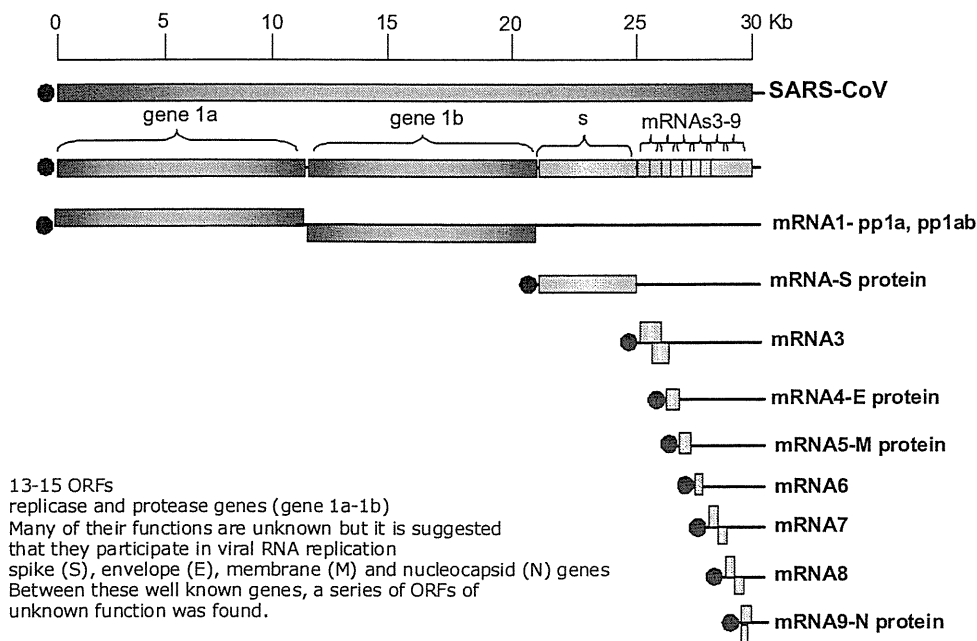


Fig. 19 SARS-CoV genome organization

SARS は、2002 年の 11 月中旬に中国広東省で流行した「非典型肺炎」に端を発し、ベトナム、香港の医療従事者を中心に感染が拡大した。引き続きカナダ、シンガポールへ広がるに至って、世界保健機構 (WHO) が 'Global Alert' を発して本格的な調査を開始し、2003 年 3 月 15 日には SARS と名

づけられて、「世界規模の健康上の脅威」である原因不明の重症非定型肺炎として扱われることになった^{24), 25)}。また、航空機の登場により、短時間で長距離の移動が可能になったことから、数ヶ月間でアメリカ、ヨーロッパ、アジアなどの 29 の国へ急速に広がりを見せた。実際には、2002 年 11 月から 2003 年 7 月末日の間に中国を中心に 8,096 人の患者が報告され、このうち 774 人が死亡している²⁶⁾。このような事態に対して、WHO が中心となり各国支援のために専門家チームが派遣され、電子情報システムを駆使した研究協力による原因病原体の同定、古典的な「隔離と検疫」を用いた院内感染を中心とした集団発生の防止などが実施された。その結果、2003 年 4 月 16 日には新種のコロナウイルスが SARS 起因病原体 (SARS-CoV) であることが発表され、7 月 5 日には感染経路の特定、確定診断の方法、特異的な治療法の確立などを待たずに、世界規模の集団発生に終息宣言が出されることとなった^{27), 28)}。

スパイクタンパク質に基づく系統発生的解析によると、SARS-CoV は 4 つのグループに分けられる (Fig. 20)²⁹⁾。グループ 1 は、2003 年に中国でハクビシンから分離されたウイルスであり、ヒト ACE2 がレセプターではない。グループ 2 は、ハクビシンやタヌキ由来のウイルス、および 2003-2004 年にヒトで散発的に発生したウイルスであり、致死的なグループ 3 のウイルスに比べて病原性が低く、ヒト ACE2 に結合する RBD を持つ。グループ 3 は、2002-2003 年に発生した、Urbani 株などの

病原性の高いウイルスである。グループ 4 はコウモリより得られた株であり、Urbani 株に比べて、12-22%のアミノ酸が異なる。これらの解析から、SARS-CoV は、キクガシラコウモリに起源を持ち、ハクビシンやタヌキに感染し、さらに種を超えてヒトへ感染したと考えられる。ハクビシンからヒトに感染した当初は、高い病原性を持たないが、ヒトからヒトへと感染が進むにつれて変異し、極めて高い病原性を持ったと考えられる。また、Fig. 20 における太線は、グループ 3 と 4 の間が系統的に離れていることを示している。

SARS-CoV による SARS の致死率は約 10%とされており、(致死率は 60 歳未満で 13.2%だが、60 歳以上では 50%と極めて高かった) 臨床経過は極めて不良である。SARS-CoV は、主に目、鼻、口などの粘膜から感染すると考えられており、その後、鼻腔、咽頭、肺などの呼吸器で増殖する。感染者のなかには下痢症状を伴う者がかなり多くみられ、ウイルスも便から検出され小腸、大腸での増殖が認められている³⁰⁾。SARS-CoV の増殖のピークは発症後 10 日頃で、重症化は 10 日以降にみられ、さらに死亡するまでには 19 日程度と隔たりがある。2003-2004 年に単発的発生が数件起こったが、それ以降、発生はない。

SARS の発生は、2004 年以降みられないが、ウイルスは間違いなく自然宿主 (コウモリ) に潜んでいる。したがって、またいつの日か、動物種を越えてヒトに猛威をふるう可能性があり、そのためにも早急なワクチンの開発が望まれる。

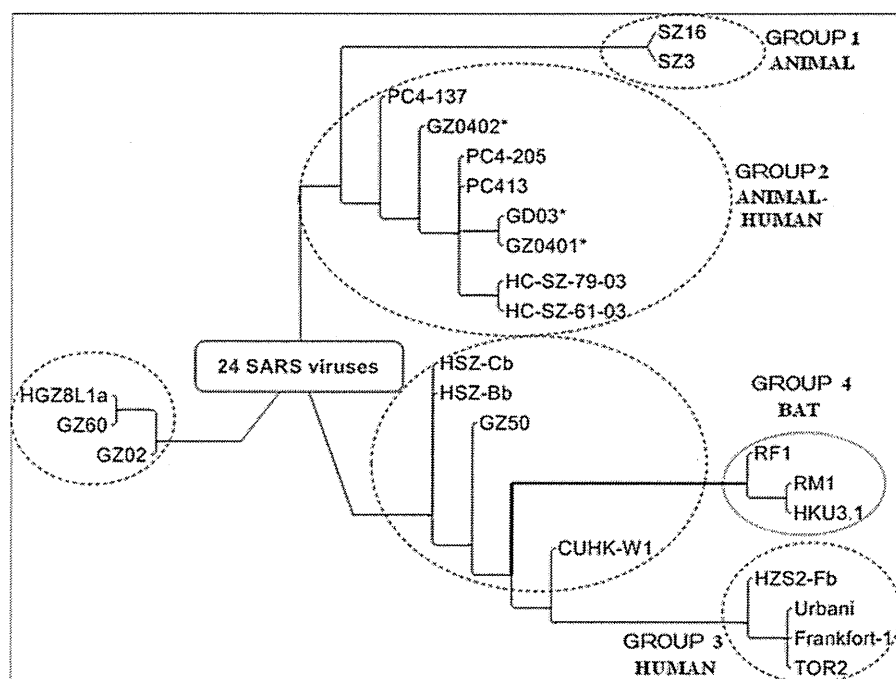


Fig. 20 Phylogenetic analysis of SARS-CoV

II-2 H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルス

インフルエンザウイルスは、オルソミクソウイルス科に属し、A・B・Cの3つの型に分類される。これらのうち、A型は特に変異型が多く、世界的大流行を起こしやすい。A型インフルエンザウイルスのゲノム遺伝子は、マイナス鎖単鎖RNAからなり、8つの分節に分かれている³¹⁾。ウイルスの構造はそれぞれがコードしているタンパク質から、hemagglutinin (HA)、neuraminidase (NA)、RNA polymerase α (PA)、RNA polymerase $\beta 1$ (PB1)、RNA polymerase $\beta 2$ (PB2)、matrix protein (M)、nucleoprotein (NP)、nonstructural protein (NS) と名づけられている (Fig. 21)。MとNSを除く6つの分節は、名前の由来になったタンパク質1種類のみをコードしているが、MとNSの2つの分節からは選択的スプライシングによって、それぞれM1とM2、NS1とNS2の2種類のタンパク質が合成される。すなわち、A型インフルエンザウイルスが合成するタンパク質は10種類である。ウイルス粒子は脂質二重膜からなる外被 (envelope) を持ち、その表面には、2種類の糖タンパク質、HA

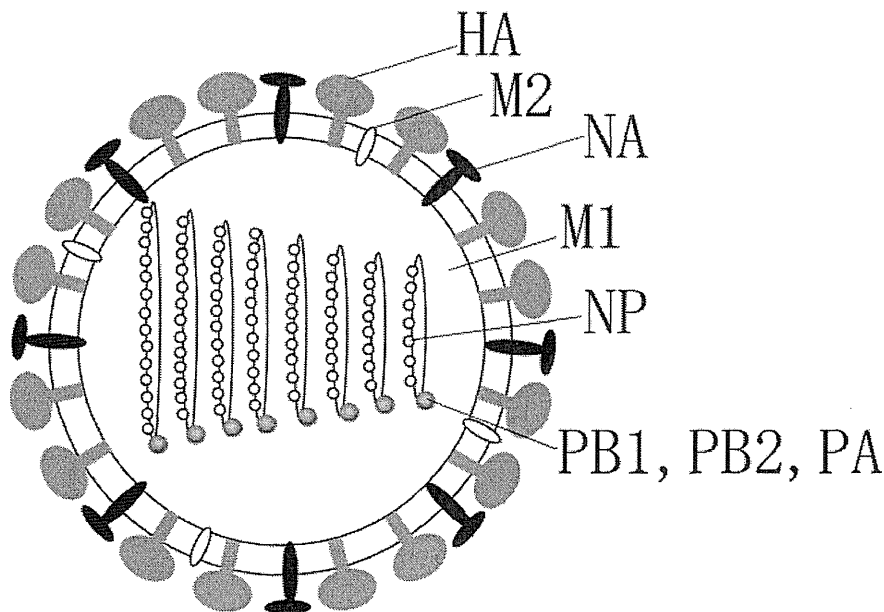


Fig. 21 Structure of the influenza A virion

と NA が外被を貫通して突き出している。さらに、envelope 内部は、8種類の RNA が多数の NP および PA、PB1、PB2 と結合して RNP (ribonucleoprotein) を形成している。RNP と外被との間には多数の M1 が充填され、少数の nonstructural protein 2 (NS2) が M1 に結合して存在している。A 型インフルエンザウイルスは、粒子表面にある HA と NA の抗原性により HA が 16 種類 (H1-H16)、

NA が 9 種類 (N1-N9) の抗原亜型に分類されている。従って、HA と NA のさまざまな組み合わせにより、理論的には数多くの A 型インフルエンザウイルスの亜型が生じうる。

A 型インフルエンザウイルスは人獣共通ウイルスであるが、もともとは鳥に起源を持ち、ヒトや獣に感染性を獲得したウイルスである。新しくヒトに感染するようになった A 型インフルエンザウイルスでは、ほとんどの人が免疫を獲得していないため、まれに爆発的な世界規模の大流行 (パンデミック) が発生している。過去に、スペインインフルエンザ (H1N1 亜型) (1918-1920)、アジアインフルエンザ (H2N2 亜型) (1957-1958)、香港インフルエンザ (H3N2 亜型) (1968-1970) のパンデミックが発生している。これらの亜型ウイルスに対して、現在、大流行が懸念されている H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスは、重篤な全身症状を呈する高病原性であり、ヒトに感染して新型インフ

ルエンザになった場合、はるかに多くの犠牲者が発生すると予想されている。

現在、世界中で、H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスの感染拡大が大きな話題となっている。H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスは、1997 年、香港で鳥が大量死し、18 人の感染者と 6 人の死者を出した³²⁾ことで、世界的にその脅威が周知されるようになった。そして 2003 年末から 2004 年にかけて日本を含むアジア諸国で H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスが広がり、ヒトへの感染もベトナム・タイで確認された。さらに 2005 年になると、その感染はヨーロッパや中東諸国、アフリカへと拡大し、2006 年以降、中国やインドネシアを中心にトルコ・イラク・エジプトなどでも多くの感染、死亡例が確認されることになった。2009 年 2 月、WHO の報告によると、世界での感染者数は 404 人で、そのうち 254 人が死亡している³³⁾。発病から 4~21 日で死亡する例が多く、死亡率は 62.9%と非常に高い。H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスに感染したヒトの、香港・タイ・ベトナム・カンボジアからの症例をまとめた Beigel らの報告³⁴⁾によると、ほぼ全例で 38℃以上の発熱、咳を認め、呼吸困難、咽頭痛、鼻汁、下痢、筋肉痛、頭痛など呼吸器外症状が見られる。早期に、ウイルス性肺炎によると考えられる下気道症状が出現し、急速に増悪する。呼吸困難は発症後 5 日目ごろに出現し、ほぼ全例で肺炎となる。重症例ではサイトカインの過剰分泌 (サイトカインストーム) となり多臓器不全で死亡する。

これまでほとんどの場合、鳥やアヒルに濃厚に接触したヒトのみが感染したと考えられ、明らかなヒトからヒトへの感染例はまだない。しかし、インフルエンザウイルスは変異をおこしやすいウイルスとして知られており、ヒトに効率よく感染する株がいつ発生してもおかしくない状況である。一方で、現在有効なワクチンが開発されていないため、現行のインフルエンザ薬やこれまでのインフルエンザワクチンに頼るしかない。厚生労働省の新型インフルエンザ専門会議は、2008 年 4 月 16 日、北里研究所と阪大微生物病研究会のワクチン原液から製造化されたプレパンデミックワクチンを、感染症指定医療機関職員、検疫所職員などからの希望者に事前接種し、有効性・安全性を評価する研究を実施することを決めた。しかし、このプレパンデミックワクチンはヒトからヒトへの感染を獲得した新型インフルエンザに対して効果が期待できるかどうかはわからず、さらに製造までに半年以上の時間がかかることなど問題点が多い。そのため、新型インフルエンザの出現による世界全土でのパンデミックを避けるためにも、現行のワクチンとは違った予防ワクチンの開発は重要である。

本研究では、ペプチド結合リポソームを使って、世界で最も人口が多い HLA-A*0201 を持つヒトをターゲットにした SARS-CoV 及び H5N1 亜型トリインフルエンザウイルスに対する CTL 誘導型の予防・治療ワクチンの開発を試みた。そのために、まず、HLA-A*0201 トランスジェニックマウスを使って、HLA-A*0201 に関連した CTL ドミナントエピトープの決定を行うこととした。SARS については、SARS-CoV の非構造タンパク質である pp1a のアミノ酸配列を使用した。pp1a は 4377 個のアミノ酸からなる極めて大きなタンパク質であり、ドミナントエピトープが同定される可能性が高い。またウイルス構造タンパク質より、感染後時間的に先に合成される非構造タンパク質であ

るため、それを免疫反応のターゲットとすれば、感染初期にウイルスを攻撃できることや、非構造性、調節性タンパク質であるため、アミノ酸変異が少ないなどの特徴がある。2種類のエピトープ予測コンピュータープログラム (BIMAS & SYFPEITHI) を用いて、エピトープの可能性の高い9個のアミノ酸配列を pp1a のアミノ酸配列から選び、HLA-A*0201 関連 SARS pp1a 由来エピトープのペプチドを作製した。各ペプチドの HLA-A*0201 の結合アフィニティと安定性を検討して、予測したエピトープによって誘導された CTL との反応性を比較検討することによりエピトープを同定した。また、ペプチド結合リポソームの投与によって、CTL の誘導についても検討した。インフルエンザウイルスに関しては、新型インフルエンザになりうる可能性の高い H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスの内部構造タンパク質、調節性タンパク質から、SARS と同様に、2種類のエピトープ予測コンピュータープログラム (BIMAS & SYFPEITHI) を用いて、エピトープの可能性の高い9個のアミノ酸配列を選び、合成ペプチドを作製した。さらに、各ペプチドの HLA-A*0201 の結合アフィニティと安定性を検討するとともに、免疫したトランスジェニックマウスでの CTL 誘導能を比較検討することにより、ドミナントエピトープの可能性を検討した。また、特に CTL 誘導能が高かったペプチドに関して、ペプチド結合リポソームを作製し、CTL の誘導能、H1N1 亜型インフルエンザウイルス、H3N2 亜型インフルエンザウイルス、H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスに対する感染防御能について検討した。

材料と方法

1. マウス

フランス・パスツール研究所の Lemonnier 博士が作製した、反応性の高い HLA-A*0201 トランスジェニックマウスを使用した。このマウスは、マウス MHC クラス I 遺伝子である H-2D^b 遺伝子とマウスβ2m 遺伝子をダブルノックアウトしたマウスに、HHD 遺伝子を挿入したトランスジェニックマウス (HHD マウス)³⁵⁾ である。HHD 遺伝子とは、MHC クラス I のα1 とα2 ドメインが HLA-A*0201 由来で、α3、transmembrane、cytoplasmic ドメインが H-2D^b からなるキメラ HLA-A*0201 遺伝子と、ヒトの β2m 遺伝子を組み合わせた遺伝子である (Fig. 22)。5' 末端側から Leader sequence (LS), ヒトβ2m (huβ2m), HLA-A*0201 α 1 domain (A2 α 1), HLA-A*0201 α 2 domain (A2 α 2), H-2D^b α 3 domain (Db α 3), H-2D^b transmembrane domain (DbTM), H-2D^b cytoplasmic domain (CP)を表す。実験にはすべて、6-8 週齢のマウスを使用した。HHD マウスは、フランス・パスツール研究所・Lemonnier 博士より供与され、埼玉医科大学動物施設で飼育・繁殖されたものを用いた。

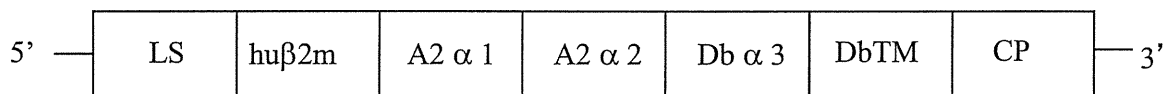


Fig. 22 Structure of the HHD gene

2. 細胞

インフルエンザウイルスのチャレンジ実験には、イヌ腎臓細胞由来 MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) 細胞を用いた。細胞は、10%ウシ胎仔血清と 2 mM の L-glutamine を加えた RPMI 1640 培地で培養した。

3. インフルエンザウイルス

10 日ほど経った孵化鶏卵の漿尿膜にインフルエンザウイルス (A/IvPR8/34、H1N1 亜型インフルエンザウイルス) (A/Aichi/2/68、H3N2 亜型インフルエンザウイルス) を感染させ、35℃に保ち、72 時間培養した。その後、4℃に冷却してウイルスの増殖を止めて、孵化鶏卵を割り、尿膜腔液中に遊出したウイルス培養液を採取した。ウイルス液は一定時間超遠心することにより、ウイルスを分離した³⁶⁾。

4. 合成ペプチド

HLA-A*0201 関連 SARS-CoV 由来ペプチドは、SARS-CoV の pp1a 領域から予測した。予測には、2 種類のエピトープ予測コンピュータープログラム (BIMAS & SYFPEITHI) を用いた。BIMAS は、MHC クラス I とペプチドの dissociation rate を指標としエピトープを予測するものであり、その値

Table 2 Prediction of SARS-CoV pp1a derived CTL epitopes on computer softwares.

Epitope	Sequence	BIMAS	SYFPE	Epitope	Sequence	BIMAS	SYFPE
pp1a-15	QLSLPVLQV	156.0	26	pp1a-2758	VLAALVCYI	224.4	26
pp1a-103	TLGVLVPHV	156.0	26	pp1a-2990	ALSGVFCGV	132.1	25
pp1a-445	TLNEDLLEI	98.4	28	pp1a-3444	VLAWLYAAV	177.4	27
pp1a-634	KLSAGVEFL	463.5	27	pp1a-3459	FLNRFITTL	373.4	27
pp1a-651	FLITGVFDI	640.2	27	pp1a-3560	MLTFLTSL	1174.4	29
pp1a-1121	ILLAPLLSA	71.9	26	pp1a-3564	FLTSLILV	735.9	25
pp1a-1139	SLQVCVQTV	160.0	28	pp1a-3616	FLLPSLATV	2722.7	33
pp1a-1288	MLSRALKKV	272.0	25	pp1a-3687	TLMNVITLV	591.9	25
pp1a-1652	YLSSVLLAL	226.0	28	pp1a-3709	SMWALVISV	958.9	28
pp1a-2187	CLDAGINYV	351.9	27	pp1a-3730	FLARAIVFV	4047.2	29
pp1a-2207	AMWLLLLSI	143.8	27	pp1a-3745	LLFITGNTL	134.4	26
pp1a-2340	WLMWFIIISI	1551.9	26	pp1a-3816	KLNKLLGL	84.0	27
pp1a-2546	ILLDQVLV	437.5	26	pp1a-3848	VLLSVLQQL	309.1	27
pp1a-2754	TLLCVLAAL	181.8	29	pp1a-4071	ALWEIQQVV	970.0	25
pp1a-2755	LLCVLAALV	118.2	25	pp1a-4219	VLGSLAATV	118.2	26

Thirty CTL epitopes derived from SARS-CoV pp1a were predicted using two kinds of computer softwares, SYFPEITHI and BIMAS.

Table 3 Prediction of H5N1 influenza virus derived CTL epitopes on computer softwares.

Epitope	Sequence	BIMAS	SYFPE	Epitope	Sequence	BIMAS	SYFPE
1)M1-1	GILGFVFTL	550.9	30	25)PA-10	LLAKSVFNSL	69.0	27
2)M1-2	LLTEVETVY	2666.3	23	26)PA-11	MLLRTAIGQV	131.0	26
3)M1-3	RMGTVITEV	50.2	22	27)PA-12	LLMDALKLSI	269.1	25
4)M1-4	SLLTEVETVY	1415.4	24	28)PB1-1	RLIDFLKDV	2492.3	27
5)M1-5	LLTEVETVYL	61.0	24	29)PB1-2	GMFNMSTV	427.5	26
6)M1-6	ILGFVFTLV	449.3	24	30)PB1-3	NMLSTVLGV	427.5	26
7)M2-1	SLLTEVETL	89.1	30	31)PB1-4	VLGVSLNL	83.5	26
8)M2-2	ILHLILWL	256.8	26	32)PB1-5	MMMGFMNML	184.4	22
9)M2-3	GILHLILWI	67.1	25	33)PB1-6	QMYQKCCTL	49.4	22
10)M2-4	GILHLILWL	76.9	25	34)PB1-7	YMFESKSMKL	1076.6	25
11)NP-1	FLARSALIL	40.3	24	35)PB1-8	IMFSNKMAL	223.2	23
12)NP-2	LLQNSQVFSL	484.5	28	36)PB1-9	GLQSSDDFAL	123.9	22
13)NP-3	SLVGIDPFRL	123.9	24	37)PB1-10	RIFLAMITYI	67.1	21
14)NS-1	IILKANFSV	348.9	24	38)PB1-11	GMMMGMFMNML	108.5	21
15)NS-2	WLMLIPKQKV	1183.8	23	39)PB1-12	RLCNLPNFV	382.5	21
16)PA-1	KLLLIQAL	636.3	28	40)PB1-13	SMMEAMVSRA	125.2	21
17)PA-2	SLPPNFSSL	40.6	26	41)PB2-1	VLGTNLQTL	83.5	28
18)PA-3	FLMDALKL	363.6	26	42)PB2-2	SLLEMCHST	113.0	23
19)PA-4	ALLKHFEEI	223.9	24	43)PB2-3	NLQTLKIKV	69.6	23
20)PA-5	SLENFRAYV	93.0	24	44)PB2-4	ILPDMTPST	51.9	22
21)PA-6	YLLAWKQVL	149.1	24	45)PB2-5	TLFQQMRDV	118.4	21
22)PA-7	CLLQSLQQL	88.8	24	46)PB2-6	ALSINELSNL	49.1	26
23)PA-8	KLSQMSKEV	243.4	22	47)PB2-7	NLTGKEKANV	69.6	21
24)PA-9	CLINDPWVL	65.7	22				

Forthfive CTL epitopes derived from H5N1 influenza virus were predicted using two kinds of computer softwares, SYFPEITHI and BIMAS.

が低いことがより抗原性の高いエピトープであることを意味している。また、SYFPEITHI は、ペプチドモチーフによりエピトープを予測するものであり、その値が高ければより抗原性の高いエピトープであることを意味している。その二つの予測プログラムで score の良いエピトープを 30 種類選び、それに相当するペプチドの合成を Operon 社に依頼した (Table 2)。

HLA-A*0201 関連 H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルス由来ペプチドは、H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスの RNA polymerase α (PA)、RNA polymerase β 1 (PB1)、RNA polymerase β 2 (PB2)、matrix protein (M1, M2)、nucleoprotein (NP)、nonstructural protein (NS1, NS2) 領域から予測した。予測には、2 種類のエピトープ予測コンピュータープログラムを用いた。その二つのプログラムで score の良いエピトープを 47 種類選び、それに相当するペプチドの合成を Operon 社に依頼した (Table 3)。

5. リポソーム

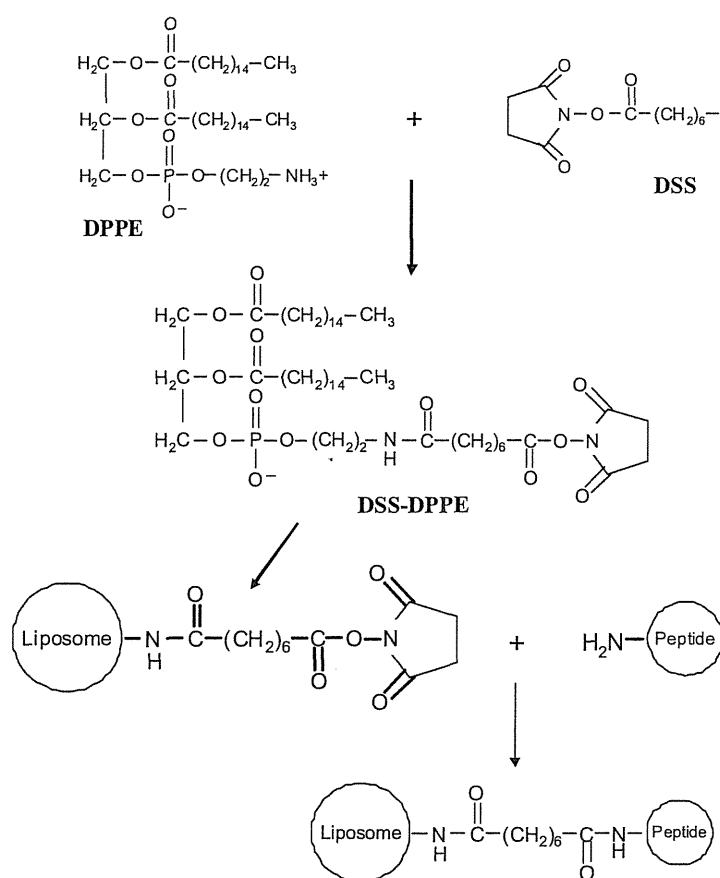


Fig. 23 Coupling of a peptide with liposome via DSS

6. 免疫

SARS-CoV 由来ペプチドを結合させたリポソーム (100 μ L) は、CpG (5'-TCCATGACGTTCTGATGTT-3', 5 μ L) を混合して、HHD マウスの foot pad に皮下注射して免疫した。

H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルス由来ペプチドを結合させたリポソーム (100 μ L) も同様に、CpG (5 μ L) を混合して、HHD マウスの foot pad に皮下注射して免疫した。またサバイバル実験・ウイルスチャレンジ実験では M1-1 ペプチドを結合させたリポソーム (Lip-M1-1, 100 μ L) 、NS-1 ペプチドを結合させたリポソーム (Lip-NS-1, 50 μ L) 、PB1-2 ペプチドを結合させたリポソーム (Lip-PB1-2, 50 μ L)、さらに CpG (5 μ L)を混合して、HHD マウスの foot pad に皮下注射して免疫した。

7. 細胞内 CD8⁺ IFN- γ ⁺ T細胞数の測定 (Intracellular cytokine staining : ICS)

免疫したマウスより得た脾臓細胞を、96 well U plate の各ウェルに 2×10^6 cells/well 加えて、1 μ L/mL の BFA と 10 μ M のペプチドと共に、37°C で 5 時間インキュベーションした。その後、細胞表面の

本研究では、Dioleoyl phosphatidyl choline (DOPC)、Dioleoyl phosphatidyl ethanolamine (DOPE)、Dioleoyl phosphatidyl glycerol (DOPG)、Cholesterol が 4:3:2:7 のモル比からなるリポソームを使用した³⁷⁾。また、ペプチドをリポソーム表面に結合させたリポソームを使用した。ペプチドの結合には Disuccinimidyl suberate (DSS) を用いた³⁸⁾。ペプチドとリポソームの結合模式図を Fig. 23 に示す。リポソームは国立感染症研究所・内田哲也博士に作製を依頼した。

Fc レセプターをブロックする目的で、CD16/CD32 モノクローナル抗体を 1 µg/well となるように入れ、4℃、10 分インキュベーションした。続いて、FITC-conjugated rat anti-mouse CD8αモノクローナル抗体を反応させた。次に、Cytofix/Cytoperm kit を用いて細胞を固定し、細胞の透過性を高めた後に、細胞内の IFN-γ を、PE-conjugated rat anti-mouse IFN-γ モノクローナル抗体と反応させた。細胞内 IFN-γ⁺ CD8⁺ 細胞数測定には、フローサイトメーターを用いた。

8. ペプチドパルスした脾細胞の静脈投与による細胞内 CD8⁺ IFN-γ⁺ T細胞誘導活性の測定

Naive の HHD マウスの脾細胞を調製し、10 µM のペプチドで 1 時間パルス処理した後、X 線を 20Gy 照射した。その後、脾細胞を 2×10⁷ 個、別の HHD マウスに静脈投与した。一週間後、静脈投与したマウスの脾細胞を、96 well U plate の各ウェルに 2×10⁶ cells/well 加えて、1 µL/mL の BFA と 10 µM のペプチドと共に、37℃で 5 時間インキュベーションし、活性化された細胞内 IFN-γ 陽性の CD8⁺ T 細胞数を上述の様にフローサイトメーターで測定した。

9. in vivo CTL 活性の測定(CTL assay)

マウスを免疫して 1 週間後、in vivo CTL assay を行った。5 µM の carboxy fluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) でラベルし、それぞれのペプチドでパルス処理した脾細胞と、0.5 µM の CFSE でラベルしペプチドでパルス処理していない脾細胞を等量ずつ混合し、免疫したマウスに静脈注射した。投与 12 時間後、CFSE でラベルした細胞の viability をフローサイトメーターで測定した。% killing は、以下の式から算出した。

$$\% \text{ killing} = [1 - \{(\text{number of cells in control mice (CFSE low)}) / (\text{number of cells in control mice (CFSE high)})\} / \{(\text{number of cells in immunized mice (CFSE low)}) / (\text{number of cells in immunized mice (CFSE high)})\}] \times 100$$

10. インフルエンザウイルスのチャレンジ実験

サバイバル実験では、HHD マウスの鼻から H1N1 亜型インフルエンザウイルス (8.43×10⁶ TCID₅₀) を感染させた。また、ウイルスチャレンジ実験では、H1N1 亜型インフルエンザウイルス (1.56×10⁵ TCID₅₀)、H3N2 亜型インフルエンザウイルス (2.5×10³ TCID₅₀)、H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルス (20 PFU) を感染させた。

マウスに免疫して、1 週間後、H1N1 亜型インフルエンザウイルスまたは H3N2 亜型インフルエンザウイルスを感染させた。さらに 4 日後、採取した肺をホモジナイズし、ウイルス液を調製した。ウイルス液は、5%FCS-DMEM で 3 倍希釈より始めて段階希釈し、これらのウイルスと MDCK 細胞を 96 穴のマルチプレートで培養した。5 日後、鳥の血球を使って、凝集反応を確認し、段階希釈したウイルス液に感染した細胞 (Well) の割合が 50%の濃度を TCID₅₀ とした。

結果

II-1 SARS コロナウイルス

1. コンピューターによる SARS-CoV pp1a 由来 CTL エピトープの予測

SARS-CoV は CTL エピトープがわずかししか同定されていない。そして SARS-CoV の非構造タンパク質である pp1 領域からはエピトープは見つかっていない。そこで著者は、SARS ウイルスの pp1a 領域のアミノ酸配列において、9-10 個のアミノ酸からなる CTL エピトープを 2 種類のコンピュータプログラムを使って予測した。そして、エピトープの可能性の高いものを 30 種類選びそれに相当するペプチドを合成した (Table 2)。

2. ペプチドパルスした脾細胞の静脈投与による細胞内 CD8⁺ IFN- γ ⁺ T細胞誘導活性の測定

Table 4 Intracellular IFN- γ staining of CD8⁺ T cells in response to predicted CTL epitopes derived from SARS-CoV pp1a.

Peptide	ICS (% in CD8 ⁺ cells)	Peptide	ICS (% in CD8 ⁺ cells)
pp1a-15	0.05	pp1a-2758	0.03
pp1a-103	0.07	pp1a-2990	0.16
pp1a-445	0.08	pp1a-3444	0.12
pp1a-634	0.08	pp1a-3459	0.03
pp1a-651	0.02	pp1a-3560	0.04
pp1a-1121	0.05	pp1a-3564	0.06
pp1a-1139	0.07	pp1a-3616	0.07
pp1a-1288	0.05	pp1a-3687	0.20
pp1a-1652	0.05	pp1a-3709	0.50
pp1a-2187	0.19	pp1a-3730	0.06
pp1a-2207	0.48	pp1a-3745	0.03
pp1a-2340	0.21	pp1a-3816	0.07
pp1a-2546	0.17	pp1a-3848	0.07
pp1a-2754	0.04	pp1a-4071	0.06
pp1a-2755	0.18	pp1a-4219	0.01

さらに、反応性の高いペプチドを選択するために、各ペプチドでパルスした HHD マウスの脾細胞を X 線照射し、別の HHD マウスに静脈投与した。一週間後、静脈投与したマウスの脾細胞をさらにペプチド刺激して、活性化された細胞内 CD8⁺ IFN- γ ⁺ T 細胞数をフローサイトメーターで測定した。その結果、9 種類のペプチド (pp1a-2187, pp1a-2207, pp1a-2340, pp1a-2546, pp1a-2755, pp1a-2990, pp1a-3444, pp1a-3687, pp1a-3709) で CD8⁺ IFN- γ ⁺ T 細胞を誘導することができた (Table 4)。

Syngeneic spleen cells from Naive HHD mice were pulsed with each peptide, and were transferred intravenously (i.v.) into another HHD mice. One week later, spleen cells of the mice were prepared, and stimulated with each relevant peptide for 5 hours. Cells were stained for their surface expression of CD8 and intracellular IFN- γ . The values shown indicate the percentages of CD8⁺ cells that are positive for intracellular IFN- γ .

3. SARS-CoV pp1a 由来エピトープ特異的細胞内 CD8⁺ IFN- γ ⁺ T 細胞数の測定

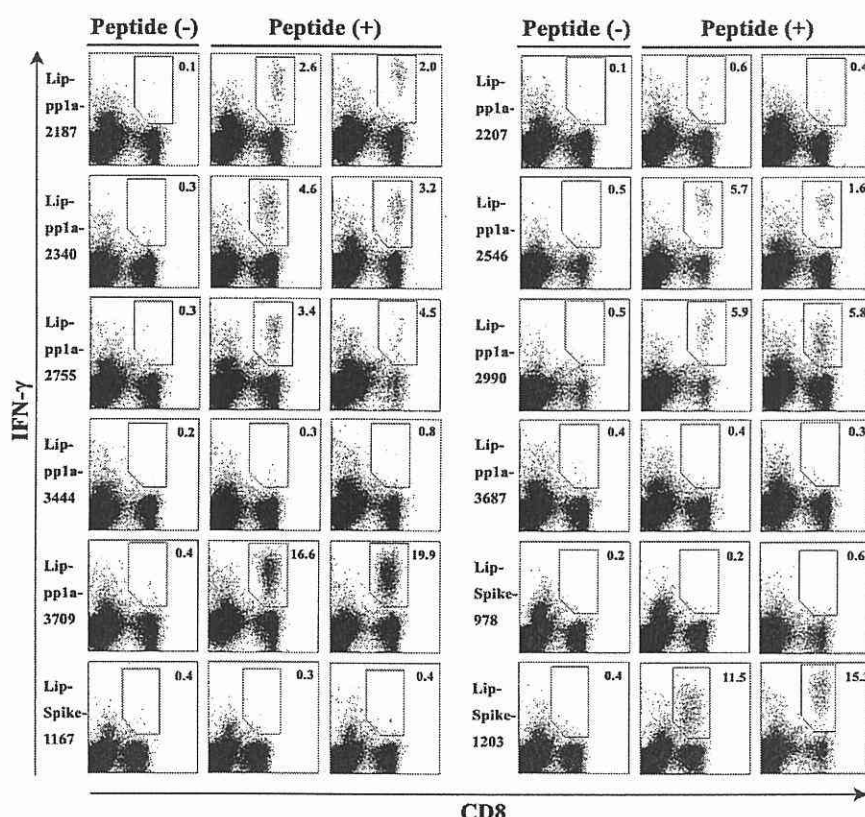


Fig. 24 Induction of IFN- γ ⁺ CD8⁺ cells in mice by immunization with surface-linked liposomal peptides derived from SARS-CoV pp1a.

Mice were immunized with each liposomal peptide derived from SARS-CoV pp1a together with liposomal helper peptide and CpG. One week later, spleen cells of the mice were prepared, and stimulated with each relevant peptide for 5 hours. Cells were then stained for their surface expression of CD8 and intracellular IFN- γ . Values shown indicate the percentages of CD8⁺ cells that are positive for intracellular IFN- γ .

静脈投与実験から CD8⁺ IFN- γ ⁺ T 細胞を誘導することができた 9 種類のペプチドについて、ペプチド結合リポソームを作製した。これらのペプチド結合リポソームと CpG を混合して、HHD マウスに免疫した。1 週間後、脾細胞を採取して、各ペプチドで刺激し、細胞内 IFN- γ ⁺ CD8⁺ T 細胞を測定した。その結果、6 種類の表面結合リポソーム

(Lip-pp1a-2187, Lip-pp1a-2340, Lip-pp1a-2546, Lip-pp1a-2755, Lip-pp1a-2990, Lip-pp1a-3709) で CD8⁺ IFN- γ ⁺ T 細胞を誘導することができた (Fig. 24)。特に Lip-pp1a-2990、Lip-pp1a-3709 を免疫したマウスでは細胞内 IFN- γ ⁺ CD8⁺ T 細胞を顕著に誘導することができた。また、すでにエピトープとして報告されて

いる Spike-978、Spike-1167、Spike-1203 についてもペプチド結合リポソーム (Lip-Spike-978, Lip-Spike-1167, Lip-Spike-1203) を作製し、同様の実験を行った。その結果、Lip-spike-978、Lip-spike-1167 の表面結合リポソームでは CD8⁺ IFN- γ ⁺ T 細胞を誘導できなかったのに対して、Lip-Spike-1203 では CD8⁺ IFN- γ ⁺ T 細胞を顕著に誘導することができた (Fig. 24)。

4. in vivo の実験系における細胞傷害活性

さらに詳細に各ペプチドの免疫原性を調べるために、in vivo の実験系における CTL の細胞傷害活性を測定した。まず、作製した結合リポソームと CpG を混ぜて、HHD マウスに免疫した。1 週間後、別の HHD マウスから採取した脾細胞を 5 μ M の CSFE でラベルし、各ペプチドでパルス処理した細胞と、0.5 μ M の CSFE でラベルし、ペプチドでパルス処理していない細胞を等量ずつ混合し、あらかじめ免疫したマウスに静注した。投与 12 時間後、CFSE でラベルした細胞の数をフローサイ

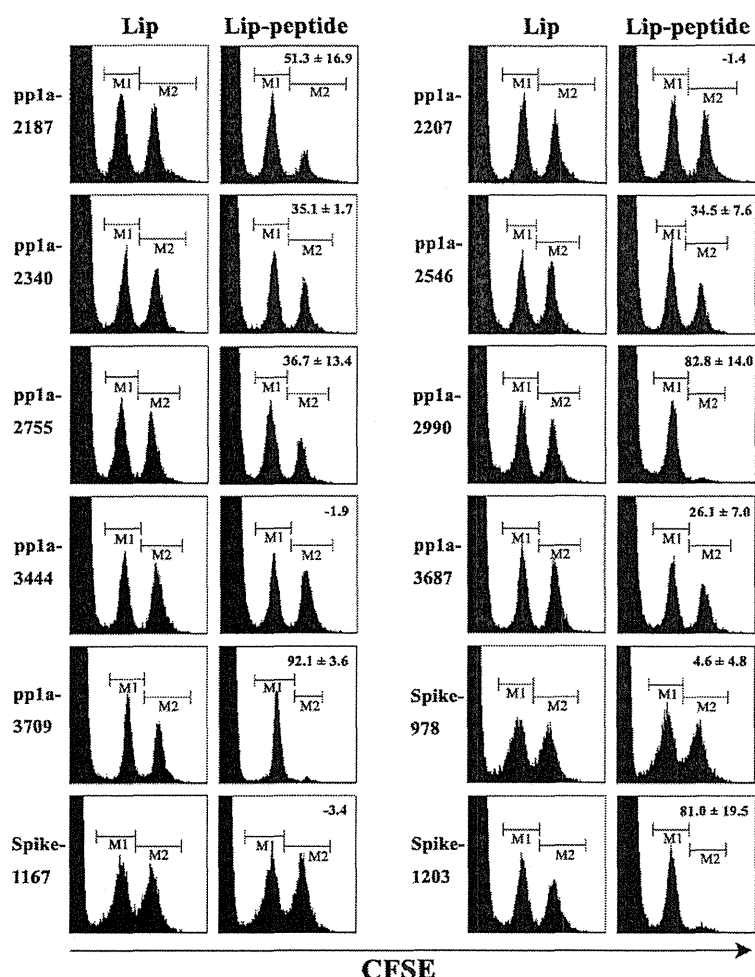


Fig. 25 In vivo killing activities in HHD mice immunized with surface-linked liposomal peptides.

HHD mice were immunized once with each liposomal peptide together with CpG in the foot pad. On week later, an equal number of a relevant peptide-pulsed CFSE targets and unpulsed CFSE targets were transferred into the immunized mice by i.v. injection. After 12 hours, CFSE-labeled cells were recovered from spleens of recipient mice and analyzed by flow cytometry. The numbers show the percentages of specific lysis.

5. ペプチド濃度による SARS-pp1a-3709 由来エピトープ特異的細胞内 $CD8^+$ $IFN-\gamma^+$ T 細胞誘導活性に対する影響

in vivo の実験系で CTL の細胞傷害活性を顕著に誘導した pp1a-2990、pp1a-3709 について、エピトープの affinity を調べる実験を行った。Lip-pp1a-2990、Lip-pp1a-3709 に関して、それぞれ、CpG と混合して、HHD マウスに免疫した。1 週間後、脾細胞を採取して、様々な濃度のペプチドで刺激し、 $IFN-\gamma^+$ $CD8^+$ T 細胞を測定した。pp1a-3709 は pp1a-2990 に比べて、低濃度のペプチドで細胞内 $IFN-\gamma^+$ $CD8^+$ T 細胞を誘導することがわかった (Fig. 26A)。このことから pp1a-3709 は affinity が強く、ドミナントエピトープとした。また、pp1a-2990 はペプチド濃度の上昇に伴って $IFN-\gamma^+$ $CD8^+$ T 細胞が誘導されることから、pp1a-2990 もドミナントエピトープとした。さらに、spike-1203 と比較して、pp1a-3709 が spike-1203 と同様の CTL 誘導能を示すことがわかった (Fig. 26B)。

トメーターで測定した。この実験でも、Fig. 24 と同様に 6 種類の表面結合リボソーム (Lip-pp1a-2187, Lip-pp1a-2340, Lip-pp1a-2546, Lip-pp1a-2755, Lip-pp1a-2990, Lip-pp1a-3709) と Lip-spike-1203 で CTL の細胞傷害活性を顕著に誘導した (Fig. 25)。

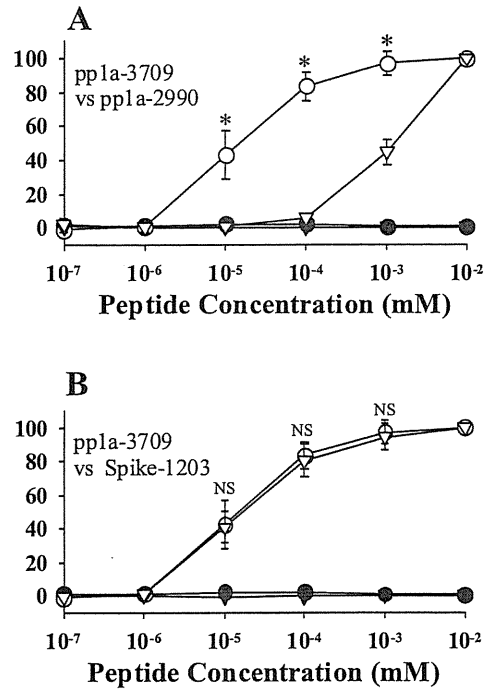


Fig. 26 Induction of IFN- γ ⁺ CD8⁺ cells in mice by immunization with surface-linked liposomal peptides derived from SARS-CoV pp1a.

Mice were immunized with each liposomal peptide derived from SARS-CoV pp1a (open symbols) or empty liposomes (closed symbols) together with CpG. One week later, spleen cells of the mice were prepared, and stimulated with each relevant peptide of either pp1a-3709 (*A* and *B* : circles) , pp1a-2990 (*A* : inverted triangles) or Spike-1203 (*B* : inverted triangles) at various concentrations for 5 hours. Cells were then stained for their surface expression of CD8 and intracellular IFN- γ . Values shown indicate % maximum of CD8⁺ cells that are positive for intracellular IFN- γ . Data are shown as the mean the percentages of CD8⁺ cells that are positive for intracellular IFN- γ \pm SEM.

II-2 H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルス

1. コンピューターによる H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルス由来 CTL エピトープの予測

H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスにおいても内部タンパク質、調節性タンパク質をターゲットとした。H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスの PA、PB1、PB2、M1、M2、NP、NS1、NS2 の領域のアミノ酸配列において、9-10 個のアミノ酸からなる CTL エピトープを SARS-CoV と同様に 2 種類のコンピュータープログラムを使って予測した。そして、エピトープの可能性の高いものを 47 種類選びそれに相当するペプチドを合成した (Table 3)。

2. ペプチドパルスした脾細胞の静脈投与による細胞内 CD8⁺ IFN- γ ⁺ T 細胞誘導活性の測定

Table 5 Intracellular IFN- γ staining of CD8⁺ T cells in response to predicted CTL epitopes derived from H5N1.

Epitope	ICS	Epitope	ICS
1) M1-1	0.81	25) PA-10	0.13
2) M1-2	0.23	26) PA-11	0.14
3) M1-3	0.13	27) PA-12	0.17
4) M1-4	0.17	28) PB1-1	0.20
5) M1-5	0.18	29) PB1-2	0.30
6) M1-6	0.84	30) PB1-3	0.37
7) M2-1	0.37	31) PB1-4	0.15
8) M2-2	NT	32) PB1-5	0.21
9) M2-3	0.42	33) PB1-6	0.21
10) M2-4	NT	34) PB1-7	0.18
11) NP-1	0.18	35) PB1-8	0.22
12) NP-2	0.13	36) PB1-9	0.16
13) NP-3	0.15	37) PB1-10	0.48
14) NS-1	0.36	38) PB1-11	0.15
15) NS-2	0.18	39) PB1-12	0.20
16) PA-1	0.22	40) PB1-13	0.13
17) PA-2	0.20	41) PB2-1	0.22
18) PA-3	0.20	42) PB2-2	0.15
19) PA-4	0.15	43) PB2-3	0.22
20) PA-5	0.24	44) PB2-4	0.15
21) PA-6	0.26	45) PB2-5	0.14
22) PA-7	0.20	46) PB2-6	0.20
23) PA-8	0.25	47) PB2-7	0.15
24) PA-9	0.20		

さらに、反応性の高いペプチドを選択するために、各ペプチドでパルスした HHD マウスの脾細胞を X 線照射し、別の HHD マウスに静脈投与した。一週間後、静脈投与したマウスの脾細胞をさらにペプチド刺激して、活性化された細胞内 CD8⁺ IFN- γ ⁺ T 細胞数をフローサイトメーターで測定した。その結果、9 種類のペプチド (M1-1, M1-6, M2-1, M2-3, NS-1, PB1-2, PB1-3, PB1-10, PB2-1) で CD8⁺ IFN- γ ⁺ T 細胞を誘導することができた (Table 5)。

Syngeneic spleen cells from Naive HHD mice were pulsed with each peptide, and were transferred intravenously (i.v.) into another HHD mice. One week later, cells were stained for their surface expression of CD8 and intracellular IFN- γ . The values shown indicate the percentages of CD8⁺ cells that are positive for intracellular IFN- γ .

3. H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルス由来エピトープ特異的細胞内 $CD8^+$ $IFN-\gamma^+$ T 細胞数の測定

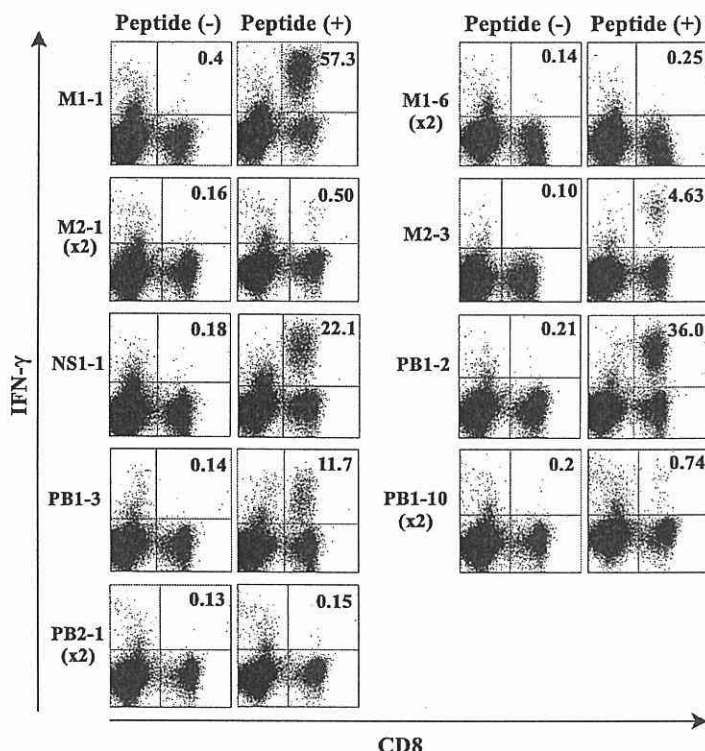


Fig. 27 Induction of $IFN-\gamma^+$ $CD8^+$ cells in mice by immunization with surface-linked liposomal peptides derived from H5N1 influenza virus.

Mice were immunized with each liposomal peptide derived from H5N1 influenza virus together with CpG. One week later, spleen cells of the mice were prepared, and stimulated with each relevant peptide for 5 hours. Cells were then stained for their surface expression of CD8 and intracellular $IFN-\gamma$. Values shown indicate the percentages of $CD8^+$ cells that are positive for intracellular $IFN-\gamma$.

4. in vivo の実験系における細胞傷害活性

次に、in vivo CTL assay で CTL の細胞傷害活性を測定した。選択した 9 種類のペプチド結合リボソームの各々と CpG を混合して、HHD マウスに免疫し、1 週間後、in vivo CTL assay を行った。5 μ M の CFSE でラベルしそれぞれのペプチドでパルス処理した細胞と、0.5 μ M の CFSE でラベルしペプチドでパルス処理していない細胞を等量ずつ混ぜ、リボソームで免疫したマウスに静注した。投与 12 時間後、CFSE でラベルした細胞の数をフローサイトメーターで測定した。この実験でも、Fig. 27 の結果と同様に、Lip-M1-1、Lip-NS-1、Lip-PB1-2 で免疫したマウスにおいて強い細胞傷害活性が認められた (Fig. 28)。

特にインフルエンザの CTL エピトープとして、強い免疫誘導を起こすことがすでに知られている M1-1 では、他のペプチドと比較して、強い細胞内 $IFN-\gamma^+$ $CD8^+$ T 細胞の誘導と CTL 活性を示した。また、これまでの結果から M1-1、NS-1、PB1-2 の 3 種類をドミナントエピトープと判断した。

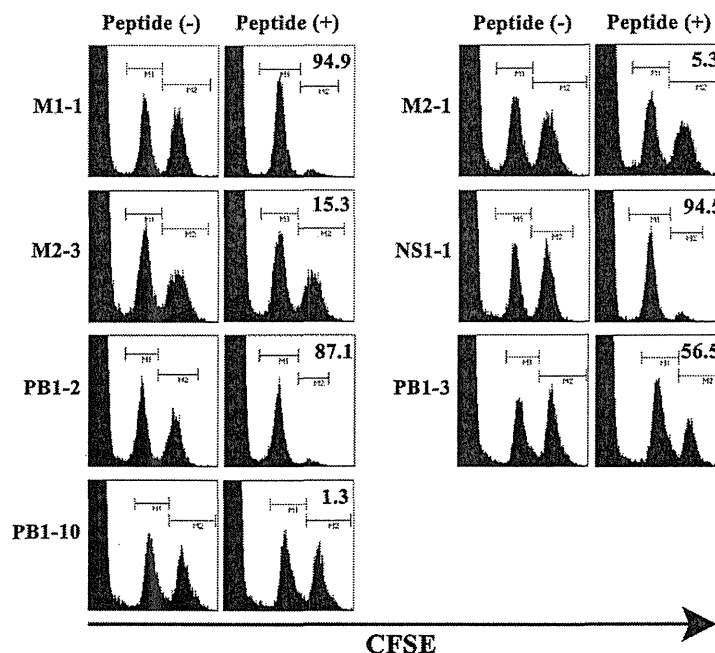


Fig. 28 In vivo killing activities in HHD mice immunized with surface-linked liposomal peptides.

HHD mice were immunized once with each liposomal peptide together with CpG in the foot pad. One week later, an equal number of a relevant peptide-pulsed CFSE targets and unpulsed CFSE targets were transferred into the immunized mice by i.v. injection. After 12 hours, CFSE-labeled cells were recovered from spleens of recipient mice and analyzed by flow cytometry. The numbers show the percentages of specific lysis.

5. H1N1、H3N2、H5N1 亜型インフルエンザウイルスを使ったウイルスチャレンジ実験

次にこれら 3 種類のペプチド結合型リポソームをマウスに免疫して、インフルエンザウイルスを感染させ、防御効果があるかどうかを調べた。H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルス (A/HongKong/156,97) から同定した 3 種類のエピトープは、著者らが使用した H1N1 亜型インフルエンザウイルス (A/IvPR8/34)、H3N2 亜型インフルエンザウイルス (A/Aichi/2/68) において、アミノ酸変異は認められなかった。そのため、ペプチド結合型リポソームをマウスに免疫して CTL を誘導できれば、これらの亜型のインフルエンザウイルスに対して発症防御が可能である。

まず、Lip-M1-1 (100 μ L)、Lip-NS-1 (50 μ L)、Lip-PB1-2 (50 μ L) さらに CpG (5 μ L) を混合して、HHD マウスの foot pad に免疫した。またコントロールの HHD マウスには表面にペプチドを結合していないリポソーム (200 μ L) を CpG と共に foot pad に投与した。1 週間後、マウスの鼻から H1N1 亜型インフルエンザウイルス (A/IvPR8/34, 8.43×10^6 TCID₅₀) を高用量感染させて、体重変化を観察した。その結果、コントロールマウスでは死亡、または体重が元に戻らない結果であったのに対して、3 種類の混合リポソームを免疫したマウスでは一時的に体重が減少したが、回復する結果となった (Fig. 29)。

なお、北海道大学人獣共通感染症リサーチセンターの協力により、同様に H5N1 亜型インフルエンザウイルス (A/HongKong/156,97, 20PFU) をマウスに感染させたサバイバル実験からも、コント

ロールマウスと比較して、3種類の混合リポソームを免疫したマウスでは体重の変化は見られなかった (Fig. 29)。

そこで、さらに詳細に調べるために、免疫したマウスに対して、鼻から H1N1 亜型インフルエンザウイルス (A/IvPR8/34, 1.56×10^5 TCID₅₀) または、H3N2 亜型インフルエンザウイルス (A/Aichi/2/68, 2.5×10^3 TCID₅₀) を感染させた時の肺のウイルス量を測定・比較した。サバイバル実験と同様に、HHD マウスに免疫して、1週間後、マウスの鼻からインフルエンザウイルスを感染させて、さらに4日後、HHD マウスの肺を採取し、ウイルスタイターを測定した。その結果、H1N1 亜型インフルエンザウイルス、H3N2 亜型インフルエンザウイルスのどちらを感染させた場合においても、コントロールマウス (non-immun) と比較して、3種類の混合リポソームを免疫したマウス (immun) では、肺のウイルス量が優位に低下していることがわかった (Fig. 30)。

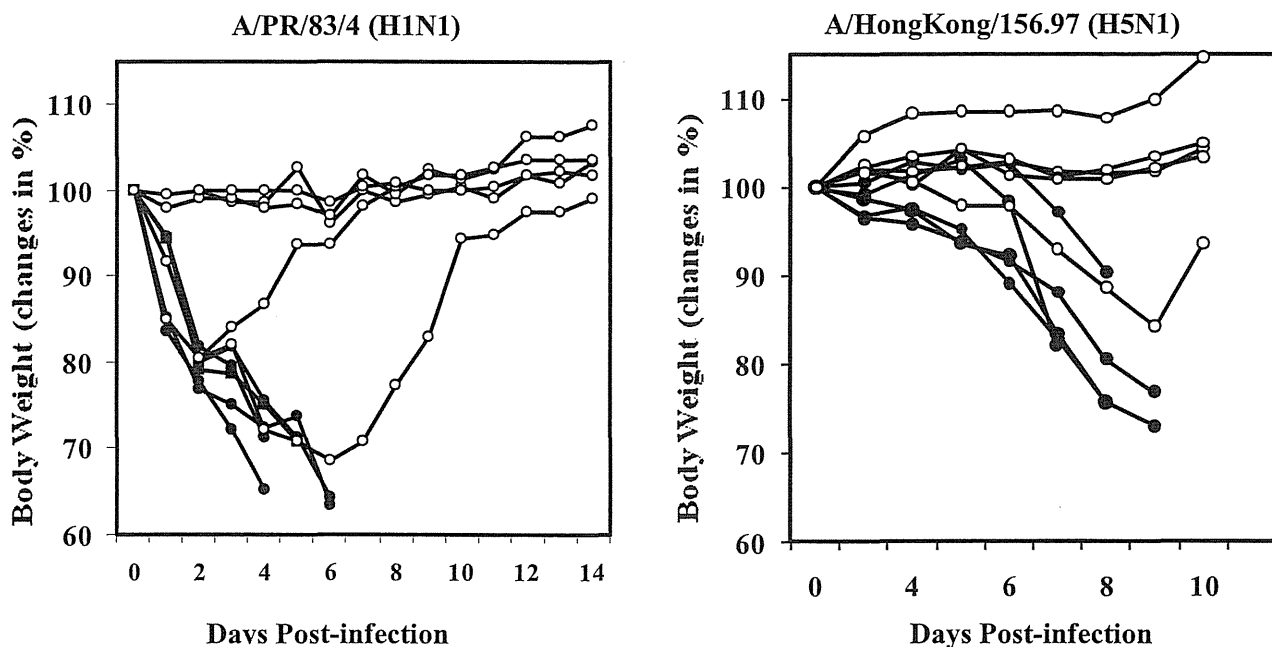


Fig. 29 Resistance to infection with A/PR/8/34 (H1N1), or A/Hongkong/156.97 (H5N1) in mice immunized with surface-linked liposomal peptides derived from A/HongKong/156.97 (H5N1).

HHD mice were immunized with either a mixture of Lip-M1-1, Lip-NS-1 and Lip-PB1-2 (open symbols) or empty liposomes (closed symbols) along with CpG. One week later, mice were challenged i.n. with either 8.43×10^6 TCID₅₀/mouse of A/PR/8/34 (H1N1) or 8.43×10^6 TCID₅₀/mouse of A/Hongkong/156.97 (H5N1).

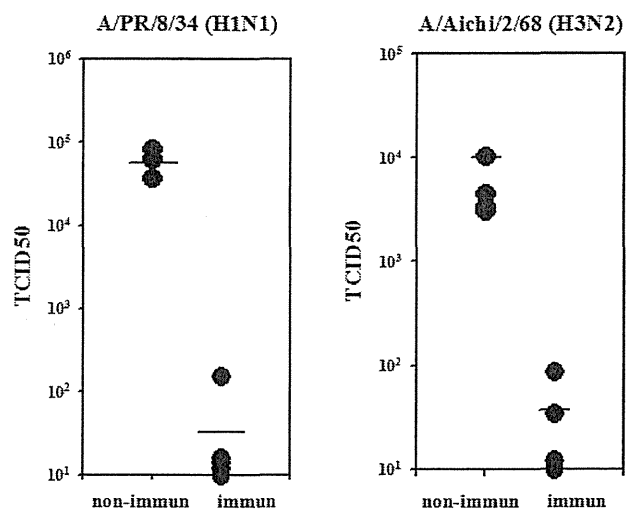


Fig. 30 Resistance to infection with A/PR/8/34 (H1N1), or A/Aichi/2/68 (H3N2) in mice immunized with surface-linked liposomal peptides derived from A/HongKong/156.97 (H5N1).

HHD mice were immunized with either a mixture of Lip-M1-1, Lip-NS-1 and Lip-PB1-2 (immun) or empty liposomes (non-immun) along with CpG. One week later, mice were challenged i.n. with either 1.56×10^5 TCID₅₀/mouse of A/PR/8/34 (H1N1) or 2.5×10^3 TCID₅₀/mouse of A/Aichi/2/68 (H3N2). Mice were sacrificed 4 days after challenge, and viral titers in the lungs were measured.

考察

多くのウイルス感染症では、種々のワクチンが開発され、感染防御に大きく貢献している。しかしながら、HIV 感染症やウイルス性肝炎などの、難治性の慢性ウイルス感染症や新しく認識された新興感染症に対しては、有効なワクチンが開発されておらず、新規ワクチンの開発が世界的に急務である。そこで著者は、強力に細胞性免疫を賦活してウイルスを完全に除去する予防ワクチンを開発するために、サイトカインをアジュバントとして使用する方法と免疫原性の高いエピトープをワクチンに使用し、ペプチド結合型リポソームと組み合わせることで強力な免疫反応を誘導する方法を検討した。

まず第 I 章では、最も強力に細胞性免疫を促進する IL-12 と構造的に極めて類似した新規サイトカイン、IL-23 の機能を理解する目的で、IL-12 または IL-23 を発現する組換え VV を作製し、これらを用いてウイルス感染防御における IL-23 の機能を、IL-12 と比較して検討をした。そして、IL-23 のアジュバント効果などの機能解析を試み、毒性の強い IL-12 に代わる免疫賦活アジュバントとしての可能性とともに、IL-23 によって産生される、IL-17 (A) のウイルス感染に対する役割について検討した。

まず、ウエスタンブロットにより、作製した組換えウイルスを感染させた細胞から、IL-12 または IL-23 が培養上清中に分泌されること、分泌された IL-12 または、IL-23 が STAT4 をリン酸化し、機能活性があることを確認した。VV-IL-12 または VV-IL-23 を感染させたマウスでは、VV-WT を感染させたマウスに比べてウイルスがより早くマウス体内から排除された。従って、IL-12 同様、IL-23 がウイルスのクリアランスに重要な役割を果たすことがわかった。また、CD8⁺ IFN- γ ⁺ T 細胞の割合は増加し、VV 特異的 CTL 活性も増加した。これらの結果から、IL-23 が IL-12 同様、VV 特異的 CTL を誘導し感染防御に効果があることがわかった。次に様々なマウスを使って、IL-23 の VV に対する感染防御能を検討した。BALB/c マウスの実験結果から、IL-23 が IL-12 と同様にウイルス抵抗性を増強すること、p40 KO マウスの実験結果から、IL-23 は IL-12 とは独立して、また IL-12 とは異なったメカニズムで VV に対する感染防御を増強することがわかった。加えて、IFN- γ KO マウスを使った実験から、IL-12 による発症防御増強作用には IFN- γ が重要であるが、IL-23 ではあまり重要でないことがわかった。さらに、抗 IL-17 抗体を投与した IFN- γ KO マウスの実験結果から、IL-23 による発症防御増強作用には IL-17 がある程度関与するが、他の因子が主要な役割を果たすことが示唆された。実際のところ、VV-IL-23 感染で IL-17 が誘導・産生されるものの、IL-17 KO マウスに VV-IL-23 を投与した場合では、発症防御増強作用に変化はみられなかった。このため VV に対する発症防御増強作用に IFN- γ と IL-17 の両者が関与していると考えられるが、Th17 から産生される他の IL-22 や IL-17F などが IL-23 による発症防御増強作用に働いていることや、まったく別のシグナル伝達経路によって発症防御を増強している可能性が示唆された。仮に、Th17 の経路ではなく、この未知の因子およびその誘導経路を同定して免疫活性化に利用できれば、IL-17 による自己免疫疾患を回避した、新しいウイルス発症防御法を見いだせる可能性がある。

本実験で注目した IL-23 は、IL-12 ファミリーに属する、新規サイトカインである。IL-12 が IFN- γ 産生によって特徴づけられる Th1 反応を促進する一方で、IL-23 は IL-17 の産生によって特徴づけられた Th17 への分化を促進する。Th17 が産生する炎症性サイトカイン IL-17 は強力な炎症誘導メディエーターとして作用し、炎症性サイトカインの産生誘導や細胞遊走、血管新生などを介して炎症を誘導する。多発性硬化症のモデルである EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis) において、IL-23 は以前考えられていた IL-12 よりも病態形成に関与していることが報告された³⁹⁾。この病態に、Th17 が関わるため、多発性硬化症の患者の中枢神経や末梢および脳脊髄液から分離した単核球において、IL-17 (A) の発現が増強していることが知られている。また、リウマチや関節炎、クローン病、Lupus、喘息などの病因として寄与しているとの報告もある。なお、Harrington や Park らによって、Th1 から Th17 へ分化していくわけではなく、Naive CD4 T 細胞からそれぞれ Th1、Th2、Th17 へ分化することが証明された⁴⁰⁻⁴²⁾。この Th17 は、Th1 でも Th2 でもない、ヘルパー T 細胞の新しい第 3 のサブセットであり、現在、免疫学で大きなトピックである。さらに、Th1 により誘導された IFN- γ 、Th2 により誘導された IL-4 が、IL-23 による Naive T 細胞から Th17 への誘導・分化を抑制することが報告されている。KO マウスを使うことで単純化された実験系とは異なり、ウイルスに対するような極めて複雑な免疫反応においては、IL-23 は単に Th17 を分化・誘導して IL-17 を産生させるだけではなく、IL-4 や IFN- γ などの複雑なサイトカインネットワークに関わる Th1 および Th2 の誘導にも何らかの影響を及ぼしており、それらのサイトカイン同士で均衡を保っていると考えられる。しかし、IL-23 および Th17 の生理的意義の詳細はまだ十分に理解されていない。

IL-23 による IL-17 の産生誘導は自己免疫疾患や炎症を引き起こすといった、一見、生体にとってマイナスな作用がある一方で、病原体感染に対する抵抗性に重要な役割を示すことが報告されている。Fedel らの報告では、*Bordetella pertussis* の感染において、IL-12 ではなく IL-23 が優先的に誘導され、その感染防御にかかわっていることを示唆している⁴³⁾。また、IL-23/Th-17 axis は *Klebsiella pneumoniae* や *Citrobacter rodentium* などの一部の細菌の感染防御に重要であることがわかった^{44), 45)}。さらに、Th17 は IL-22 も産生する。IL-22 は IL-23 により誘導される皮膚炎を仲介するが、HIV に対する抵抗性に関わること、IL-23/Th-17/IL-17 が好中球を誘導し、IL-23 は病原体侵入に対する速効型防御反応を引き起こすことも推測されている。今回の実験においても、IL-23 が VV 感染に対するマウスの抵抗性を高め、さらに、IL-17 産生を誘導していることを見出した。さらに IL-23 では産生誘導能が弱いとされていた IFN- γ の産生誘導も認められた⁴⁰⁾。従って、本実験結果から VV 感染において、IL-23 は Th1 と Th17 の両方を誘導して共に overlap して作用し、IFN- γ と IL-17 が分泌され、VV の抵抗性を高めているのではないのかと推測できる。つまり、IL-23 は細胞性免疫を高めるため、IL-12 に代わるアジュバントとしての可能性があると考えられるものである。

IL-23 が発見されて間もなく、我々は IL-23 が IL-12 と同様にウイルス特異的細胞傷害性 T 細胞の誘導を促進することをマウスの系で示した。その後、IL-23 が Th1 だけでなく、Th17 の誘導に重要

な役割を果たし、自己免疫疾患に密接に関係することが示された。しかし、他のグループからも IL-23 がある種の細菌の感染防御に関わることや、腫瘍免疫を促進することが示されたように、我々の結果からも IL-23 の重要な生理学的役割の一つは病原体に対する感染防御であることが示された。これらの研究により、IL-23 がウイルス感染症や癌の免疫療法において有効な免疫アジュバントとして利用されると共に、IL-23 による IL-17 産生誘導の抑制による、自己免疫疾患や種々の炎症を抑制する治療法が開発されることが期待される。また、今まで説明されてきた Th1、Th2 だけではなく、IL-23 によって誘導された Th17 を含めた複雑な免疫システムがさらに解明されることを期待する。

第Ⅱ章では、ここ数年の間に出現した新しい感染症である SARS と新型インフルエンザをターゲットに研究を行った。これらの新興感染症は世界的な感染拡大はしていないものの、自然界にリザーバーが存在していることから、いつ感染が拡大してもおかしくない状況である。特に H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスは新型インフルエンザの原因になるのではないかと考えられている。そこで、ペプチド結合リポソームを利用した CTL 誘導型ワクチンの開発を試みた。

まず、SARS コロナウイルスおよび H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルス由来の新しい HLA-A2 拘束性 CTL エピトープを多数同定し、その中から反応性の高いドミナントエピトープを明らかにした。通常、ウイルスの CTL エピトープを同定するには、ウイルス感染患者の末梢血リンパ球と対象となるウイルスが必要である。また、SARS や H5N1 亜型鳥インフルエンザでは、ウイルス感染材料を BSL3 施設で取り扱う必要があり、その施設のない埼玉医大など多くの研究機関では実験できない。そこで我々は、反応性の高い HLA-A2 トランスジェニックマウス (HHD マウス) とペプチド結合リポソームを使用することにより、この問題を解決した。すなわち、コンピュータプログラムを利用し、エピトープとなるペプチドを予測した。そして、同定したドミナントエピトープを結合したペプチド結合リポソームを作製し、HHD マウスに免疫して、ウイルス特異的 CTL の誘導を詳細に検討し、ペプチド結合リポソームの CTL 誘導型ワクチンとしての有用性を示した。以上の操作は、埼玉医科大学微生物学教室の BSL2 施設で行える。つまり、危険なウイルス材料を使用しなくても、CTL エピトープを多数同定することが可能となったわけである。また、変異の少ない内部タンパク質、内部調節性タンパク質からエピトープを予測したため、このエピトープを使って CTL を誘導すれば、どの亜型のインフルエンザでも予防に有効である可能性が高くなる。そのため、微生物学教室の BSL2 施設で使用可能である H1N1 亜型、H3N2 亜型インフルエンザウイルスを使って、感染防御実験も行うことができる。

本研究では、HLA-A*0201 拘束性のエピトープの免疫原性を種々の方法で調べ、ドミナントエピトープを探索した。ドミナントエピトープは、免疫原性が高いエピトープと定義できるもので、具体的には、1) 活性の高い CTL (high avidity CTL) を誘導できること (質的)、および、2) そのエピトープ特異的 CTL を多数誘導できること (量的)、であると考えられる。CTL assay では、誘導された CTL の、エピトープ特異的な killing 活性の強さを評価するものであり、したがって、ドミナントエピトープ判定の中核となる。さらに、細胞内 IFN- γ ⁺ CD8⁺ T 細胞数の測定では、エピトープ特異的

に活性化されて IFN- γ を産生・分泌する CTL の数を算定できる。この方法では、flow cytometry による測定の前に、免疫マウスの脾細胞を *in vitro* でペプチドと培養するが、わずか 5 時間であるため細胞の *in vitro* での増殖は考慮する必要がない。また、CTL から分泌される IFN- γ は、体内でのウイルス排除において重要な役割を果たすと考えられていることから、有効な CTL の数がわかるという点でこのアッセイは意義がある。

まず、SARS-CoV の pp1a 領域から 9 個のアミノ酸からなる CTL エピトープを 2 種類のコンピュータープログラムを使って予測した。そして、エピトープの可能性の高いものを 30 種類選択し、それらに相当するペプチドを合成した。さらに、反応性の高いペプチドを選択するために、静脈投与したマウスの脾細胞から活性化された細胞内 CD8⁺ IFN- γ ⁺ T 細胞数を測定した。その結果、9 種類のペプチド (pp1a-2187, pp1a-2207, pp1a-2340, pp1a-2546, pp1a-2755, pp1a-2990, pp1a-3444, pp1a-3687, pp1a-3709) で CD8⁺ IFN- γ ⁺ T 細胞を誘導することができた。続いて、CD8⁺ IFN- γ ⁺ T 細胞を誘導できた 9 種類のペプチドと、すでにエピトープとして報告されている Spike-978, Spike-1167, Spike-1203 について、ペプチド結合リポソームを作製した。これらのペプチド結合リポソームと CpG を混合し、HHD マウスに免疫して、細胞内 CD8⁺ IFN- γ ⁺ T 細胞の測定を行った。その結果、6 種類の表面結合リポソーム (Lip-pp1a-2187, Lip-pp1a-2340, Lip-pp1a-2546, Lip-pp1a-2755, Lip-pp1a-2990, Lip-pp1a-3709) で CD8⁺ IFN- γ ⁺ T 細胞を誘導することができた。また、Lip-Spike-1203 では細胞内 CD8⁺ IFN- γ ⁺ T 細胞を誘導することが可能であったのに対して、Lip-Spike-978, Lip-Spike-1167 では誘導できなかった。特に Lip-pp1a-3709, Lip-pp1a-2990 を免疫したマウスでは細胞内 CD8⁺ IFN- γ ⁺ T 細胞を顕著に誘導することができた。さらに *in vivo* の実験系で CTL の細胞傷害活性を測定したところ、この実験でも、6 種類の表面結合リポソームと Lip-spike-1203 で免疫した場合に高い細胞傷害活性が認められた。特に Lip-pp1a-2990, Lip-pp1a-3709 で免疫したマウスにおいて高い細胞傷害活性が認められた。反応の高かった pp1a-2990, pp1a-3709 について、濃度に依存したペプチド刺激による、細胞内 CD8⁺ IFN- γ ⁺ T 細胞の誘導能を調べた。その結果、pp1a-3709 は pp1a-2990 に比べて、低濃度のペプチドで細胞内 CD8⁺ IFN- γ ⁺ T 細胞を誘導することから、affinity が高いことがわかった。さらに、pp1a-3709 は Spike-1203 と比較すると、低濃度でも Spike-1203 と同様に CD8⁺ IFN- γ ⁺ T 細胞の誘導能があることがわかった。以上より、pp1a-3709 と pp1a-2990 をドミナントエピトープであると考えた。なお、今回の実験では、同定した pp1a のエピトープをコードする遺伝子を挿入した組換え VV を作製することができなかつたため、ウイルスチャレンジ実験は、今後の課題であると考えられる。

次に H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスの内部タンパク質、調節性タンパク質のアミノ酸配列において、9 個のアミノ酸からなる CTL エピトープを SARS-CoV と同様に 2 種類のコンピュータープログラムを使って予測した。これより、エピトープの可能性の高いものを 47 種類選び、それらに相当するペプチドを合成した。さらに、反応性の高いペプチドを選択するために、静脈投与したマウスの脾細胞中の活性化された細胞内 CD8⁺ IFN- γ ⁺ T 細胞数を測定した。9 種類のペプチド (M1-1,

M1-6, M2-1, M2-3, NS-1, PB1-2, PB1-3, PB1-10, PB2-1) がCD8⁺ IFN- γ ⁺ T細胞を誘導することが確認できた。静脈投与による測定結果から、上記9種類のペプチドについて、ペプチド結合リポソームを作製することにした。これらのペプチド結合リポソームと CpG を混合して、HHD マウスに免疫し、CD8⁺ IFN- γ ⁺ T 細胞の測定を行った結果、3 種類のペプチド結合リポソーム (Lip-M1-1, Lip-NS-1, Lip-PB1-2) で極めて顕著に細胞内 CD8⁺ IFN- γ ⁺ T 細胞を誘導することができた。さらに、in vivo の実験系で CTL の細胞傷害活性を測定することにした。選択した 9 種類のペプチド結合型リポソームと CpG を混合して、HHD マウスに免疫し、in vivo CTL assay を行った。この実験においても、Lip-M1-1、Lip-NS-1、Lip-PB1-2 を免疫したマウスにおいて、強い細胞傷害活性が認められ、特にインフルエンザの CTL エピトープとして、強い免疫誘導を起こすことがすでに知られている M1-1 では、他のペプチドと比較して、強い細胞内 CD8⁺ IFN- γ ⁺ T 細胞の誘導と CTL 活性の増強作用を示した。これまでの結果を総合して、M1-1、NS-1、PB1-2 をドミナントエピトープと判断した。次にこれら 3 つのペプチド結合リポソームをマウスに免疫して、インフルエンザウイルスの感染防御が可能かどうかを調べた。まず、Lip-M1-1、Lip-NS-1、Lip-PB1-2 さらに CpG を混合し、HHD マウスの foot pad に免疫し、マウスの鼻から H1N1 亜型インフルエンザウイルスまたは H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスを高用量感染させて、体重変化を観察した。その結果、3 種類のペプチド結合リポソームを免疫したマウスでは感染後体重は元に戻ったが、さらに詳細に調べるために、マウスの鼻から H1N1 亜型インフルエンザウイルスまたは、H3N2 亜型インフルエンザウイルスを感染させた時の肺のウイルス量を比較することにした。表面にペプチドを結合していないリポソームを免疫したコントロールマウスと比較して、3 種類の混合リポソームを免疫したマウスでは肺のウイルス量が有意に低下していることがわかった。以上、本研究では SARS-CoV、H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスのドミナントエピトープの同定に基づき、それを結合させたりポソームで CTL を効率よく誘導することに成功した。また、ペプチド結合リポソームを使用することによって、インフルエンザウイルス抵抗性を増強させることが確認できた。つまり、異なる亜型のインフルエンザウイルスに対しても発症防御が可能なユニバーサルワクチンの開発に大きく前進したものと考え、リポソームを使った CTL 誘導型ワクチンの創製に繋がるものと期待する。

本研究では CTL 誘導型ワクチンの開発を検討してきたが、SARS-CoV、H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスに対して CTL を誘導する今後の治療戦略については以下のように考えている。SARS 治療ワクチンを開発する上で、すでに SARS-CoV に感染したマウスの血清が SARS-CoV の増殖を抑えたことから、中和抗体が感染防御に重要であると考えられる⁴⁶⁾。特に、抗体の結合する抗原決定基が Spike 領域内のレセプター結合ドメインに存在することから、S タンパク質が中和抗体の抗原として最も重要と思われる。実際に、病状が回復した人の血清中に、S タンパク質のみに対する中和抗体が存在していることから証明されている⁴⁶⁾。一方、SARS-CoV に対する細胞性免疫の役割は、現在までに明確ではない。急性期においては、患者の 95% で CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞数の減少がみられるが、回復するにつれて T 細胞数は増加する。また、ある HLA Class I アリー

ルが SARS の病状に関係しているため CTL が一定の割合をしていると考えられており、実際に、病状が回復した患者において、CTL が強力に誘導され、S や N タンパク質から CTL エピトープが同定されている。Yang らによると、S タンパク質を発現する DNA ワクチンによって中和抗体と S 特異的 CTL が誘導されたが、SARS-CoV の増殖を抑えたのは中和抗体であったとの報告がある⁴⁶⁾。

しかし、CTL は S タンパクなどの構造タンパク質のみでなく、調節性タンパク質に対しても誘導できることから、CTL のドミナントエピトープが、小さな S タンパク質よりも、大きな調節性タンパク質領域に存在する可能性はより高い。最近、SARS から自然に回復した人の免疫反応を調べたところ、強い CTL が検出されており⁴⁶⁾、他のウイルス感染症と同様に、CTL が宿主防御に重要であることを強く示唆している。大きな特徴は、そのウイルス由来のタンパク質すべてに対して、特異的な CTL を誘導できるという点である。変異した S タンパクは中和抗体と反応しないが、CTL では、変異の少ない N タンパク質や調節性タンパク質に対しても誘導することが可能であり、アミノ酸変異による影響を最小限に抑えられる。SARS-CoV の場合、極めて大きな pp1a と pp1b があり、そこにドミナントエピトープが存在する可能性は高く、そのように保存されたエピトープに対する CTL を誘導できれば、ヒトの SARS-CoV と共に、動物に自然感染してヒトに猛威をふるう可能性のある SARS-CoV 様ウイルスの両方を防御しうるワクチンが開発できる可能性がある。SARS-CoV 由来の CTL エピトープは、Spike 領域由来 HLA-A*0201 拘束性 CTL エピトープ 4 種類のみが他グループによって同定されているものの、効率良く免疫するには複数のエピトープを利用する必要がある。そのため、本研究で、pp1a 領域からドミナントエピトープを同定し、CTL を誘導することは予防ワクチンとして有効な方法であると考えられる。

インフルエンザ予防ワクチンの開発においては、一般的に、ウイルスエンベロープタンパク質である HA と NA に対する抗体がインフルエンザの予防に大きく関わっていると考えられている⁴⁷⁾。しかし、変異ウイルスが出現した場合には HA・NA の抗原性が変化するため、現行のワクチンは無効であり、新しいウイルス亜型に対して中和できないと考えられ、パンデミックアウトブレイクには対応できない。つまり、抗体では、新たに発生する新型インフルエンザウイルスの抗原を予測して感染を予防することはできないと考えてよく、一方で CTL はそれが可能である。そのため、どのインフルエンザの亜型でも変異のないエピトープを利用して、cross-reactive で強力な CTL を誘導することで、様々な亜型のインフルエンザウイルスに対しても有効なユニバーサルワクチンを開発することが当然必要となる。実際、CD8⁺T cell を除いたマウスにおいてインフルエンザウイルスを感染させた場合、肺のウイルスタイターが増加し、死亡率も上昇した⁴⁸⁾ことから、インフルエンザウイルス感染防御に cross-reactive なエピトープを認識する CTL が仲介していることは明らかである。さらに、ヒトにおいては、McMichael ら⁴⁹⁾が同様の事象について実証している。以前に H1N1 亜型インフルエンザウイルスに感染したヒトの一部は、H2N2 亜型インフルエンザウイルスのパンデミックに対して感染防御できたとの報告がある⁵⁰⁾。また、H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスに感染していないヒトの末梢血に cross-reactive な CTL が存在し、この CTL が H5N1 亜型

鳥インフルエンザウイルスを認識し、感染細胞を殺すことができた⁵¹⁾。その場合、nucleoprotein のような内部構造タンパク質のエプトープが、cross-reactive な CTL を誘導することが最も重要なファクターとなる⁵²⁾。

このような理由から、CTL は抗体よりも新型インフルエンザの予防に有効であると考えられる。一般に、ウイルスに対する免疫防御反応は、体液性免疫と細胞性免疫が両輪として働く必要がある。しかし、CTL を誘導することだけでも、体内のかんりのウイルスを減少させることができ、症状を軽減することが可能であろう。我々の実験結果でも、あらゆる亜型のインフルエンザウイルスの体内ウイルス量を低下することができた。つまり、この理由からも強力に特異的 CTL を誘導できるペプチド結合リポソームはユニバーサルワクチンとなりうる。

今回、HLA-A*0201 拘束性 CTL エピトープの免疫原性をさまざまな方法で調べ、SARS-CoV および H5N1 亜型インフルエンザウイルスに対するドミナントエピトープを明らかにした。この実験には、高反応性の HLA-A*0201 トランスジェニックマウスが有効であり、このようにして、ドミナントと判定したエピトープをワクチンに使用し、特異的 CTL の誘導をコントロールできれば、感染症を治癒させることに有効であると思われる。今後は、あらゆるタイプの HLA に対しても効果の高いワクチンの開発が課題となろう。

治療ワクチンとして、CTL を賦活化する方法は重要な方法である。しかし、難治性のウイルス感染症に対して、強力な免疫誘導を起こすことは非常に難しく、安全性も含めて、強力に免疫を賦活する方法が望まれている。本研究では、SARS-CoV、H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスのドミナントエピトープの同定に基づき、それを結合させたりポソームで CTL を効率よく誘導することに成功した。またドミナントエピトープを含むペプチド結合リポソームを使って、インフルエンザウイルス抵抗性を増強させることが明らかになった。つまり、異なる亜型のインフルエンザウイルスに対しても感染防御できる、ユニバーサルワクチンの開発に前進をもたらしたと言える。さらに、リポソームを使った CTL 誘導型ワクチンの創製に、大きく近づけたとともに、その免疫反応を上げるために、サイトカインなどをリポソーム内に内包して投与する可能性も向上した。本研究でウイルス感染防御が確認できた IL-23 はその候補であり、IL-23 の作用に続くシグナル伝達経路を活性化させる方法は有効な手段の 1 つと考えられる。現在までのところ明確なプロセスは不明であるものの、今後、Th17 の誘導を含めた詳細な経路を明らかにし、ペプチド結合リポソームにサイトカインの活性経路を応用したワクチンの実用化を目指したい。

また、本研究の表面結合リポソームを利用した CTL 誘導型ワクチンは、厚生労働科学研究費補助金 (医療機器開発推進研究事業：ナノメディシン研究) 「細胞性免疫誘導能を持つペプチド結合リポソームを応用したウイルスワクチンの創製」研究班の成果発表会において、大きな反響を呼んでおり、インフルエンザの‘万能ワクチン’として広く一般にも知られるようになった。また、新型インフルエンザのワクチンのみならず、季節性のインフルエンザウイルスの感染者を減らすこと

ができる大きな期待が寄せられており、今後の研究結果はより一層重要なものになってくると考えられる。またこの表面結合リポソームを使用すれば、現在難治性とされている感染症のワクチンとして非常に有用である。今後、そういったウイルス感染症に対しても、CTL 誘導型ワクチンを開発して、多くのウイルス感染症に対する‘万能ワクチン’となるようにさらなる研究・開発を重ねていきたい。

謝辞

本博士論文作成にあたり、ご指導とご鞭撻を承りました城西大学薬学部教授 林秀徳先生に深く感謝致します。

本研究、博士論文作成にあたり、実際にご指導いただいた、埼玉医科大学微生物学教室准教授 松井政則先生に深く感謝の意を表します。

また、お忙しいなか、ご指導いただきました、埼玉医科大学総合医療センター薬剤部 大野悟史博士、埼玉医科大学微生物学教室教授 赤塚俊隆先生、同准教授 守屋修先生をはじめとする、微生物学教室の諸先生方に深く感謝致します。

本研究に際し使用した、HHD マウスを供与していただいたフランス・パスツール研究所 Lemonnier 博士、IL-12 発現プラスミドを供与していただいた東京医科大学 善本隆之博士、ペプチド結合リポソームを作製していただいた国立感染症研究所 内田哲也博士、IL-17 KO マウスを供与していただいた東京大学医科学研究所 岩倉洋一郎博士に感謝致します。

博士論文作成、博士論文発表にあたり、協力をいただいた城西大学薬学部臨床生化学教室の皆様にお礼を申し上げます。

本論文の作成、提出に際し、ご指導とご鞭撻を承りました城西大学薬学部教授 近藤誠一先生、同教授 日比野康英先生に心より感謝致します。

参考文献

- 1) A. Charles, Jr. Janeway, P. Travers, M. Walport, M. J. Shlomchik and T. Sasazuki, 免疫生物学-免疫系の正常と病理, 南光堂, **5**, (2003).
- 2) 市村宏, 臨床と微生物, **27**, 3-10 (2000).
- 3) P. J. Bjorkman, M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennett, J. L. Strominger and D. C. Wiley, *Nature*, **329**, 506-512 (1987).
- 4) M. A. Saper, P. J. Bjorkman and D. C. Wiley, *J. Mol. Biol.*, **219**, 277-319 (1991).
- 5) J. Trowsdale, I. Hanson, I. Mockridge, S. Beck, A. Townsend and A. Kelly, *Nature*, **348**, 741-744 (1990).
- 6) M. Attaya, S. Jameson, C. K. Martinez, E. Hermel, C. Aldrich, J. Forman, K. F. Lindahl, M. J. Bevan and J. J. Monaco, *Nature*, **355**, 647-649 (1992).
- 7) K. Falk, O. Rotzschke, S. Stevanovic, G. Jung and H. G. Rammensee, *Nature*, **351**, 290-296 (1991).
- 8) T. S. Jardetzky, W. S. Lane, R. A. Robinson, D. R. Madden and D. C. Wiley, *Nature*, **353**, 326-329 (1991).
- 9) R. R. Pogue, J. Eron, J. A. Frelinger and M. Matsui, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 8166-8170 (1995).
- 10) 松井政則, 臨床免疫, **30**, 938-946 (1998).
- 11) D. R. Milich, *Adv. Immunol.*, **45**, 195-282 (1989).
- 12) M. Taneichi, H. Ishida, K. Kajino, K. Ogasawara, Y. Tanaka, M. Kasai, M. Mori, M. Nishida, H. Yamamura, J. Mizuguchi and T. Uchida, *J. Immunol.*, **177**, 2324-2330 (2006).
- 13) B. P. Leonard, M. L. Sherman, G. L. Fisher, L. J. Buchanan, G. Larsen, M. B. Atkins, J. A. Sosman, J. P. Dutcher, N. J. Vogelzang and J. L. Ryan, *Blood*, **90**, 2541-2548 (1997).
- 14) G. Trinchieri, S. Pflanz and R. A. Kastelein, *Immunity*, **19**, 641-644 (2003).
- 15) D. J. Cua, J. Sherlock, Y. Chen, C. A. Murphy, B. Joyce, B. Seymour, L. Lucian, W. To, S. Kwan, T. Churakova, S. Zurawski, M. Wiekowski, S. A. Lira, D. Gorman, R. A. Kastelein and J. D. Sedgwick, *Nature*, **421**, 744-748 (2003).
- 16) C. A. Murphy, C. L. Langrish, Y. Chen, W. Blumenschein, T. McClanahan, R. A. Kastelein, J. D. Sedgwick and D. J. Cua, *J. Exp. Med.*, **198**, 1951-1957 (2003).
- 17) L. Zhou, II. Ivanov, R. Spolski, R. Min, K. Shenderov, T. Egawa, DE. Levy, WJ. Leonard and DR. Littman, *Nat. Immunol.*, **8**, 967-74 (2007).

- 18) L.H. McCurdy, J.A. Rutigliano, T.R. Johnson, M. Chen and B.S. Graham, *J. Virol.*, **78** 12471-9.(2004).
- 19) M. Matsui, O. Moriya, M. L. Belladonna, S. Kamiya, F. A. Lemonnier, T. Yoshimoto and T. Akatsuka, *J. Virol.*, **78**, 9093-9104 (2004).
- 20) S. Naito, A. Horino, M. Nakayama, Y. Nakano, T. Nagai, J. Mizuguchi, K. Komuro and T. Uchida., *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **109**, 223-228 (1996).
- 21) A. Mark, B. Björkstén and M. Granström, *Vaccine*, **13**, 669-673 (1995).
- 22) T. Nagata, T. Toyota, H. Ishigaki, T. Ichihashi, K. Kajino, Y. Kashima, Y. Itoh, M. Mori, H. Oda, H. Yamamura, M. Taneichi, T. Uchida and K. Ogasawara, *Vaccine*, **25**, 4914-4921 (2007).
- 23) V. Thiel, K.A. Ivanov, A. Putics, T. Hertzog, B. Schelle, S. Bayer, B. Weissbrich, E. J. Snijder, H. Rabenau, H. W. Doerr, A. E. Gorbalenya and J. Ziebuhr. *J. Gen. Virol.*, **84**, 2305-2315 (2003).
- 24) World Health Organization Issues: Communicable Disease Surveillance and Response: Severe acute respiratory syndrome (SARS) : Status of the outbreak and lessons for the immediate future. WHO, Geneva, **20** May 2003.
- 25) World Health Organization Issues: Emergency travel advisory, WHO, Geneva, **15** March 2003.
- 26) World Health Organization issues: Epidemic and Pandemic Alert and Response: Severe acute respiratory syndrome(SARS): WHO, Geneva, **21** April 2004
- 27) World Health Organization issues: Communicable Disease Surveillance and Response: Consensus document on the epidemiology of severe acute respiratory syndrome (SARS). WHO, Geneva, **23**, May 2003.
- 28) 重松美加, 岡部信彦, *臨床と微生物*, **31**, 59-64 (2004)
- 29) L. Enjuanes, M.L. Dediego, E. Alvarez, D. Deming, T. Sheahan and R. Baric, *Virus Res.*, **133**, 45-62 (2008).
- 30) W. K. Leung, K. To, P. K. S. Chan, H. L. Y. Chan, A. K. L. Wu, N. Lee, K. Y. Yuen and J. J. Y. Sung, *Gastroenterology* , **125**, 1011-1017 (2003).
- 31) 牧野昌子, 河岡義裕, *日本臨床* **63**, 2005-12 (2005)
- 32) K.Y. Yuen, P.K. Chan, M. Peiris, D.N. Tsang, T.L. Que, K.F. Shortridge, P.T. Cheung, W.K. To, E.T. Ho, R. Sung and A.F. Chen, *Lancet*, **351**, 467-71 (1998).
- 33) Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A / (H5N1) Reported to WHO, **2** February 2009
- 34) J.H. Beigel, J. Farrar, A.M. Han, F.G. Hayden, R. Hyer, M.D. de Jong, S. Lochindarat, T.K. Nguyen, T.H.

- Nguyen, TH. Tran, A. Nicoll, S. Touch and KY. Yuen, *N. Engl. J. Med.*, **353**, 1374-85 (2005).
- 35) S. Pascolo, N. Bervas, J. M. Ure, A. G. Smith, F. A. Lemonnier and B. Perarnau, *J. Exp. Med.*, **185**, 2043-2051 (1997).
 - 36) R. Cottey, C. A. Rowe and B. S. Bender, *Current Protocols in Immunology*, 19.11.1-19.11.32 (2001).
 - 37) Y. Nakano, M. Mori, S. Nishinohara, Y. Takita, S. Naito, H. Kato, M. Taneichi, K. Komoro and T. Uchida, *Bioconjug. Chem.*, **12**, 391-395 (2001).
 - 38) Y. Nakano, M. Mori, S. Nishinohara, Y. Takita, S. Naito, A. Horino, H. Kato, M. Taneichi, K. Komuro and T. Uchida. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **120**, 199-208 (1999).
 - 39) Y. Chen, CL. Langrish, B. McKenzie, B. Joyce-Shaikh, JS. Stumhofer, T. McClanahan, W. Blumenschein, T. Churakovsa, J. Low, L. Presta, CA. Hunter, RA. Kastelein and DJ. Cua, *J. Clin. Invest.*, **116**, 1317-26 (2006).
 - 40) L. E. Harrington, R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy and C. T. Weaver, *Nature Immunol.*, **6**, 1123-1132, (2005).
 - 41) H. Park, Z. Li , X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y. H. Wang, Y. Wang , L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian, C. Dong, *Nature Immunol.*, **6**, 1133-1141, (2005).
 - 42) T. A. Wynn, *Nature Immunol.*, **6**, 1069-1070, (2005).
 - 43) G. Fedele, P. Stefanelli, F. Spensieri, C. Fazio, P. Mastrantonio, C. M. Ausiello , *Infect. Immun.*, **73**, 1590-1597, (2005).
 - 44) KI. Happel, PJ. Dubin, M. Zheng, N. Ghilardi, C. Lockhart, LJ. Quinton, AR. Odden, JE. Shellito, GJ. Bagby, S. Nelson and JK. Kolls, *J. Exp. Med.*, **202**, 761-9 (2005).
 - 45) PR. Mangan, LE. Harrington, DB. O'Quinn, WS. Helms, DC. Bullard, CO. Elson, RD. Hatton, SM. Wahl, TR. Schoeb and CT. Weaver, *Nature*, **441**, 231-4 (2006).
 - 46) 松井政則, 高山俊輔, 内田哲也, *臨床免疫・アレルギー科*, **50**, 511-517, (2008).
 - 47) JC. de Jong, AM. Palache, WE. Beyer, GF. Rimmelzwaan, AC. Boon and AD. Osterhaus, *Dev. Biol. (Basel)*, **115**, 63-73 (2003).
 - 48) S. Liang , K. Mozdzanowska, G. Palladino and W. Gerhard, *J. Immunol.*, **152**, 1653-61 (1994).
 - 49) AJ. McMichael, FM. Gotch, GR. Noble, PA. Beare, *N. Engl. J. Med.*, **309**, 13-7 (1983).
 - 50) SL. Epstein, *J. Infect. Dis.*, **193**, 49-53 (2006).
 - 51) J. Jameson, J. Cruz, M. Terajima, FA. Ennis, *J. Immunol.*, **162**, 7578-83 (1999).

- 52) HJ. Zweerink, SA. Courtneidge, JJ. Skehel, MJ. Crumpton and BA. Askonas, *Natur*, **26**, 7354-6 (1977).

